

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

**Bell & Howell Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600**

UMI[®]

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**CARACTÉRISATION PHARMACOLOGIQUE DES RÉCEPTEURS NATIFS DU
NEUROPEPTIDE Y ET DE LA NOCICEPTINE**

par

LENG-HONG PHENG

Département de pharmacologie

Thèse présentée à la faculté de médecine en vue de l'obtention

du grade de *Philosophia* Doctor (Ph.D.)

Mai 2000



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-67587-4

Canada

À mes parents...

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	i
LISTE DES PUBLICATIONS	iii
LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX.....	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	v
RÉSUMÉ	vii
INTRODUCTION	1
1. Généralités sur le neuropeptide Y (NPY) et la nociceptine (NC)	
1.1 Découverte, isolement et structure primaire.....	1
1.1.1 Neuropeptide Y	1
1.1.2 Nociceptine.....	4
1.2 Localisation et distribution.....	6
1.2.1 NPY et ses homologues.....	6
1.2.2 Nociceptine.....	7
1.3. Clonage et distribution des récepteurs.....	9
1.4 Effets biologiques du NPY et de la NC.....	13
1.4.1 Effets centraux.....	13
1.4.2 Effets périphériques.....	16
2. Sites réceptoriels	18
2.1 Historique	18
2.2 Rôles physiologiques proposés	20
2.3 Classification	22
2.3.1 Récepteurs du NPY	22
2.3.2 Récepteur de la NC.....	26
3. Objectifs de l'étude	27
RÉSULTATS.....	30
Article 1	
<i>The dog saphenous vein: a sensitive and selective preparation for the Y-2</i> <i>receptor of neuropeptide Y.....</i>	30
Sommaire	31
Article 2	
<i>The rabbit ileum: A sensitive and selective preparation for the neuropeptide Y Y₃</i> <i>receptor</i>	33
Sommaire	34
Article 3	

<i>Neuropeptide Y-induced contraction is mediated by neuropeptide YY2 and Y4 receptors in the rat colon</i>	36
Sommaire	37
Article 4	
<i>Receptors for NPY in peripheral tissues: Bioassays</i>	39
Sommaire	40
Article 5	
<i>[Nphe¹]nociceptin-(1-13)NH₂ selectively antagonizes nociceptin effects in the rabbit isolated ileum</i>	43
Sommaire	44
DISCUSSION	46
1. Préparations tissulaires	49
1.1. Préparations vasculaires	49
1.2. Vasa deferentia et préparation d'origine intestinale	54
1.2.1 Vas deferens de rat et de lapin	54
1.2.2 Préparations d'origine intestinale : l'iléon de lapin	56
1.2.3 Côlon descendant de rat	61
CONCLUSION	67
REMERCIEMENTS	69
BIBLIOGRAPHIE	70
LISTE DES PUBLICATIONS	105

LISTE DES PUBLICATIONS

Pour cette thèse:

PHENG, L.H., FOURNIER, A, DUMONT, Y., QUIRION, R. & REGOLI, D. (1997).

The dog saphenous vein: a sensitive and selective preparation for the Y₂ receptor of neuropeptide Y. *Eur. J. Pharmacol.* **327** (2-3): 163-167.

PHENG, L.H., QUIRION, R., IYENGAR, S., FOURNIER, A. & REGOLI, D. (1997).

The rabbit ileum: A sensitive and selective preparation for the neuropeptide Y Y₅ receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **333** (2-3) : R3-R5.

PHENG, L.H., PERRON, A., QUIRION, R., CADIEUX, A., FAUCHÈRE, J.L.,

DUMONT, Y. & REGOLI, D. (1999). Neuropeptide Y-induced contraction is mediated by neuropeptide YY₂ and Y₄ receptors in the rat colon. *Eur. J. Pharmacol.* **374**(1) : 85-91.

PHENG, L.H. & REGOLI, D. (2000). Receptors for NPY in peripheral tissues:

Bioassays. *Life Sci.* **67** (8) : 847-862.

PHENG, L.H., CALO, G., GUERRINI, R. & REGOLI, D. (2000). [Nphe¹]nociceptin-(1-

13)NH₂ selectively antagonizes nociceptin effects in the rabbit isolated ileum. *Eur. J. Pharmacol.* **397**(2-3): 383-388.

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Tableau 1

Alignements des séquences en acides aminés du NPY, du PYY, du PP et du PY2

Tableau 2

Alignements des séquences en acides aminés de la NC et des peptides opioïdes5

Tableau 3

Caractéristiques des différents récepteurs clonés du NPY23

Tableau 4

Caractéristiques des différents de récepteurs clonés des peptides opioïdes25

LISTE DES ABRÉVIATIONS

NPY	Neuropeptide Y
PYY	Peptide YY
PP	Polypeptide pancréatique
PY	Polypeptide pancréatique Y
NC	Nociceptine
NE	Norépinéphrine
ACh	Acétylcholine
VIP	Peptide vasoactif intestinal
ADH	Hormone antidiurétique
TTX	Tétradotoxine
RT-PCR	“Reverse transcriptase Polychain Reaction”
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
SNC	Système nerveux central
SNA	Système nerveux autonome
SNS	Système nerveux sympathique
SNP	Système nerveux parasympathique
NANC	Non-cholinergique non-adrénergique
ORL1	“Opioid receptor-like 1”
OP4	Récepteur “Opioid peptide 4”

y6	récepteur du NPY de type 6
LH	“Luteinizing hormone”
Protéine G	Protéine liante au nucléotide guanine
BIBP3226	((R)-N ² -(diphenylacetyl)-N-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-argininamide
BIBO3304	R-N-[(4-Aminocarbonylaminomethyl)methyl]-N ² -(diphenylacetyl) argininamide(trifluoroacetate)
SR120819A	(1-[2-[2-(2-naphtylsulfamoyl)-3-phenylpropionamido]-3-[4-N[4-(dimethylaminomethyl)-cis-cyclohexylmethyl]amido]phenyl]propionyl]pyrrolidine, (R,R) stereoisomer)
GW1229	Ile-Glu-Pro-Dap-Tyr-Arg-Leu-Arg-Tyr-NH ₂ , cyclic (2,4')(2',4) diamide
BIIE246	((S)-N ₂ -[[1-[2-[4-[(R,S)-5,11-Dihydro-6(6h)-oxodibenz[b,e]azepin-11-yl]-1-piperazinyl]-2-oxoethyl]cyclopentyl]acetyl]-N-[2-[1,2-dihydro-3,5(4H)-dioxo-1,2-diphenyl-3H-1,2,4-triazol-4-yl]ethyl]-argininamid)
CGP71683A	Naphtalene-1-sulfonic acid {4-[(4-amino-quinazolin-2-ylamino)-methyl]- <i>trans</i> [cyclohexyl]methyl}
SYNAPTIC 28	2-(Naphtalen-1-ylamino)-3-phenylpropionitrile
SYNAPTIC 34	<i>N</i> -(4-{[Naphtalen-2-ylmethyl]-amino}-methyl)- <i>trans</i> [cyclohexyl]methyl)-2-nitro-benzensulfonamide
[F/G]NC(1-13)NH ₂	[Phe ¹ ψ(CH ₂ -NH)Gly ²]NC(1-13)NH ₂

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE
**CARACTÉRISATION PHARMACOLOGIQUE DES RÉCEPTEURS NATIFS DU
 NEUROPEPTIDE Y ET DE LA NOCICEPTINE**

par

LENG-HONG PHENG

Département de pharmacologie
 Thèse présentée à la faculté de médecine en vue de l'obtention
 du grade de *philosophia Doctor* (Ph.D.)

RÉSUMÉ

Cette thèse porte sur la pharmacologie de deux neuropeptides retrouvés dans le SNC. Il s'agit du neuropeptide Y (NPY), un peptide de 36 acides aminés qui fait partie d'une famille comprenant le polypeptide pancréatique (PP) et le peptide YY (PYY), et de la nociceptine (NC), un neuropeptide de 17 acides aminés qui possède une homologie structurale avec les peptides opioïdes. Le NPY et la NC exercent plusieurs effets biologiques importants tant au niveau central qu'en périphérie. Au moins quatre types de récepteurs du NPY (Y_1 , Y_2 , Y_4 et Y_5) et un seul de la NC (ORL1) ont été clonés. La présente étude avait pour buts d'identifier et de mettre au point des essais biologiques *in vitro* pour les études fonctionnelles et la classification des récepteurs natifs du NPY et de la NC en périphérie. Six préparations biologiques sensibles au NPY ont été caractérisées dont la veine saphène et le vas deferens de lapin qui sont deux préparations enrichies en récepteurs Y_1 et le vas deferens de rat qui est enrichi en récepteurs Y_2 . La veine saphène de chien, une préparation récemment identifiée, a été choisie pour caractériser les récepteurs Y_2 post-jonctionnels. L'utilisation de plusieurs agonistes du NPY et antagonistes sélectifs pour le récepteur Y_2 ont permis de confirmer que cette préparation est un système monorécepteuriel de type Y_2 . Le côlon de rat, une ancienne préparation utilisée pour étudier les récepteurs de type Y_3 , répond par une contraction aux NPY, PYY, rPP, hPP ainsi qu'aux agonistes non-sélectifs des récepteurs Y_1 et Y_2 . Les profils pharmacologiques des agonistes et antagonistes ont permis de statuer sur l'existence de deux récepteurs, le Y_2 et le Y_4 . L'iléon de lapin est une nouvelle préparation pharmacologique qui répond par des relaxations aux PYY, hPP et faiblement aux NPY et rPP. Le profil pharmacologique obtenu avec des agonistes et antagonistes ainsi que l'étude du mécanisme d'action suggèrent que le récepteur du NPY dans l'iléon de lapin est atypique (Y_4 , Y_5 , y_6 ?) et semble être exprimé au niveau pré-jonctionnel. Les mêmes tissus et d'autres ont été utilisés pour mettre au point des préparations sensibles à la NC. Par exemple, l'iléon de lapin montre une bonne sensibilité pour la nociceptine (NC), laquelle exerce ses effets biologiques via l'activation du récepteur ORL1. La caractérisation du récepteur ORL1 de la NC a été réalisée avec de nouveaux agonistes et antagonistes développés dans le cadre d'un projet de collaboration avec l'Université de Ferrara en Italie. L'iléon de lapin répond à la NC par une relaxation (réduction de l'activité spontanée) qui semble être relayée par le même mécanisme que celui responsable de l'effet du NPY. En effet, la NC inhiberait la libération constante d'acétylcholine du plexus myentérique. Le récepteur de la NC serait donc localisé au niveau pré-jonctionnel, tel qu'il en est pour celui (ou ceux) du NPY. Les mêmes conditions s'appliquent à une autre préparation, le côlon de rat, qui répond par une contraction à la NC via un récepteur ORL1 atypique.

INTRODUCTION

La présente étude porte sur deux neuropeptides, le neuropeptide Y et la nociceptine, qui ont été identifiés dans le système nerveux central et qui exercent plusieurs effets importants tant au niveau central qu'en périphérie. Ces peptides ont en commun certains effets biologiques au niveau du cerveau et en périphérie : ils possèdent des récepteurs dans les mêmes organes et tissus. Ils appartiennent cependant à deux familles distinctes de récepteurs. Nous avons cru opportun d'étudier les deux peptides et leurs récepteurs dans les mêmes tissus périphériques étant donné ils semblent exercer des effets communs au niveau central.

1. GÉNÉRALITÉS SUR LE NEUROPEPTIDE Y ET LA NOCICEPTINE

1.1 Découverte, isolement et séquençage

1.1.1 Neuropeptide Y

Le neuropeptide Y (NPY), le peptide YY (PYY) et le polypeptide pancréatique (PP) sont composés de 36 acides aminés (Tableau 1). Le NPY et le PYY ont été initialement isolés, respectivement à partir du cerveau et de l'intestin de porc par TATEMOTO et MUTT en 1980 et ils ont ensuite été séquencés (TATEMOTO, 1981, 1982). Parmi ces peptides, le NPY a été le mieux conservé durant l'évolution. En fait, le NPY humain a une homologie structurale presque identique à celle du porc sauf pour le résidu en position 17 qui est une Met chez l'homme et une Leu chez le porc. Tous ces peptides se terminent avec une tyrosine, dont le groupement carboxyl est amidé. Le PYY et le PP représentent respectivement 70% et 50% d'homologie avec le NPY. Par

Tableau # 1

Alignements des séquences en acides aminés du NPY, du PYY et du PP. Le caractère en gras et souligné indique le résidu qui est différent du celui retrouvé dans le peptide humain

	1	10	20	30	Différence
NPY					
humain	Y P S K P D N P G E D A P A E D M A R Y Y S A L R H Y I N L I T R Q R Y-NH ₂				
rat	Y P S K P D N P G E D A P A E D M A R Y Y S A L R H Y I N L I T R Q R Y-NH ₂				
porc	Y P S K P D N P G E D A P A E D <u>L</u> A R Y Y S A L R H Y I N L I T R Q R Y-NH ₂				1
cobaye	Y P S K P D N P G E D A P A E D M A R Y Y S A L R H Y I N L I T R Q R Y-NH ₂				
poisson	Y P <u>N</u> K P D N P G E <u>G</u> A P A E D L A K Y Y S A L R H Y I N L I T R Q R Y-NH ₂				3
PYY					
humain	Y P I K P E A P G E D A S P E E L N R Y Y A S L R H Y L N L V T R Q R Y-NH ₂				
rat	Y P <u>A</u> K P E A P G E D A S P E E L <u>S</u> R Y Y A S L R H Y L N L V T R Q R Y-NH ₂				2
porc	Y P <u>A</u> K P E A P G E D A S P E E L <u>S</u> R Y Y A S L R H Y L N L V T R Q R Y-NH ₂				2
cobaye	Y P <u>S</u> K P E A P G <u>S</u> D A S P E E L <u>A</u> R Y Y A S L R H Y L N L V T R Q R Y-NH ₂				3
poisson	Y P <u>P</u> K P E <u>N</u> P G E D A <u>P</u> P E E L <u>A</u> <u>K</u> Y Y <u>S</u> <u>A</u> L R H Y <u>I</u> N L <u>I</u> T R Q R Y-NH ₂				9
PP					
humain	A P L E P V Y P G D D A T A E Q M A Q Y A A D L R R Y I N M L T R P R Y-NH ₂				
rat	A P L E P <u>M</u> Y P G D Y A T <u>H</u> E Q <u>R</u> A Q Y <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> L R R Y I N <u>T</u> L T R P R Y-NH ₂				8
porc	A P L E P V Y P G D D A T <u>P</u> E Q M A Q Y A A <u>E</u> L R R Y I N M L T R P R Y-NH ₂				2
cobaye	A P L E P V Y P G D D A T <u>P</u> <u>Q</u> Q M A Q Y A A <u>E</u> <u>M</u> R R Y I N M L T R P R Y-NH ₂				4
oiseaux	<u>G</u> P <u>S</u> <u>Q</u> P <u>T</u> Y P G D D A <u>P</u> <u>V</u> E <u>D</u> <u>L</u> I <u>R</u> <u>F</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>N</u> L <u>Q</u> <u>Q</u> Y <u>L</u> N <u>V</u> <u>V</u> T R <u>H</u> R Y-NH ₂				20

cette forte homologie structurale, ces trois peptides ont été rassemblés au sein d'une même famille appelée la famille PP (polypeptide pancréatique) (TATEMOTO *et al.*, 1982) car le PP a été le premier peptide isolé à partir du pancréas de poulet au milieu des années 70 par KIMMEL et ses collaborateurs (KIMMEL *et al.*, 1975). Cependant, d'un point de vue phylogénique, le NPY semble être le peptide le plus ancien tandis que le PYY et le PP semblent avoir évolué par duplications géniques à partir du gène du NPY (LARHAMMAR, 1996). Il a donc été proposé par IUPHAR (International Union of Pharmacology Recommendations : MICHEL *et al.*, 1998) que ces trois peptides soient considérés membres de la famille du NPY.

Il existe un quatrième membre de cette même famille qui n'a été que très peu étudié. Il s'agit du peptide PY qui a été isolé à partir du pancréas de poissons (ANDREWS *et al.*, 1985). Ce peptide possède une forte homologie (83%) avec le NPY et le PYY mais il n'exerce aucun effet biologique chez les mammifères.

Tous les membres de la famille du NPY ont des caractéristiques communes d'un point de vue conformationnel. Ils sont constitué d'une structure rigide composée d'une séquence polyproline (résidus 2-8) et d'une hélice α amphiphilique (résidus 14-32), lesquelles sont reliés entre elles par un repli β de type I. Les interactions de ce complexe entraînent la formation d'une boucle dont la structure d'ensemble ressemble à celle d'une épingle à cheveux. Cette conformation tridimensionnelle du peptide a été révélée à l'aide de techniques de cristallographie et de diffraction aux rayons X ainsi que par la des études de modélisation moléculaire (GLOVER *et al.*, 1985; ALLEN *et al.*, 1987; MacKERELL *et al.*, 1988; SCHWARTZ *et al.*, 1989; MacKERELL, 1989). Cette structure en forme d'épingle à cheveux que l'on nomme aussi un repli PP, semble être une structure qui

favorise le rapprochement des extrémités N- et C-terminales du peptide; ce qui pourrait contribuer à la reconnaissance et à l'activation des récepteurs par le NPY et ses congénères. De plus, il a été suggéré que ce repli PP permettrait au peptide d'être résistant à la dégradation enzymatique dans des conditions *in vitro* (O'HARE *et al.*, 1990); bien que le NPY et le PYY soient dégradés assez rapidement *in vivo* (EBERLEIN *et al.*, 1989; GRANDT *et al.*, 1996). La dipeptidyl peptidase IV, connue aussi sous le nom de CD26, est une enzyme qui clive les deux premiers résidus du N-terminus du NPY ou du PYY pour générer de longs fragments C-terminaux (NPY₃₋₃₆ ou PYY₃₋₃₆) (MENTLEIN *et al.*, 1993). Ces fragments sont des métabolites actifs qui agissent comme agonistes sélectifs sur certains types de récepteurs du NPY (voir ci-dessous).

1.1.2 Nociceptine

La nociceptine (NC) est un nouveau neuropeptide qui exerce une multitude d'effets centraux aussi importants que ceux induits par le NPY. La NC est composée de 17 acides aminés et elle a été initialement identifiée et isolée à partir de cerveaux de porc et de rat (REINSCHIED *et al.* 1995; MEUNIER *et al.*, 1995). La NC a été découverte après son récepteur ORL-1 (Opiode Receptor Like-1). Le clonage du récepteur ORL₁ sera décrit dans la section "Site récepteuriel". La nociceptine est connue aussi sous le nom d'orphanine FQ et elle est classée dans la famille des peptides opioïdes car elle possède certaines homologies structurales avec les opioïdes endogènes. Dans le tableau 2, on peut constater que la NC possède trois motifs de séquences communes avec celles des peptides opioïdes : il s'agit de 1) la séquence térapeptide "Phe-Gly-Gly-Phe" dans l'extrémité N-terminale qui est similaire à la séquence "Tyr-Gly-Gly-Phe", retrouvée dans les peptides opioïdes; 2) la présence de résidus basiques dans la portion C- terminale, en analogie avec

Tableau # 2

Alignements des séquences en acides aminés de la NC et des peptides opioïdes. Le caractère en gras et souligné indique le résidu qui est similaire à celui retrouvé dans la NC.

Nociceptine/Orphanine FQ	F G G F T G A R K S A R K L A N Q
Dynorphine A	Y <u>G</u> <u>G</u> <u>F</u> L R R I R P K L <u>K</u> W D <u>N</u> <u>Q</u>
Dynorphine B	Y <u>G</u> <u>G</u> <u>F</u> L R R Q F K V V T
α -Endorphine	Y <u>G</u> <u>G</u> <u>F</u> M T S E <u>K</u> <u>S</u> Q T P <u>L</u> V T
β -Endorphine	Y <u>G</u> <u>G</u> <u>F</u> M T S E <u>K</u> <u>S</u> Q T P <u>L</u> V T L F K N A I I K N A Y K K G E
Met-Enkephaline	Y <u>G</u> <u>G</u> <u>F</u> M
Leu-Enkephaline	Y <u>G</u> <u>G</u> <u>F</u> L
Endomorphine 1	Y P W <u>F</u> -NH ₂
Endomorphine 2	Y P F <u>F</u> -NH ₂

la dynorphine A et la β -endorphine et 3) les séquences répétitives dans la portion C-terminale (Ala-Arg-Lys-X-Ala-Arg-Lys-Ala) qui ressemblent à celles retrouvées dans le C-terminus des β -endorphines des mammifères (Lys-Asn-Ala-X-X-Lys-Asn-Ala) (REINSCHIED *et al.*, 1995).

Comme les autres peptides opioïdes, la NC est synthétisée à partir d'un gros précurseur protéique, la prépronociceptine qui montre des homologies structurales (13 à 27%) avec la préproenkephaline, la préprodynorphine et la préproopiomélanocortine (MOLLEREAU *et al.*, 1996; NOTHACKER *et al.*, 1996). Dans la séquence de la prépro-NC, on retrouve seulement une copie de la NC (résidus 135-151) flanquée par deux paires de résidus basiques qui représentent les sites potentiels de clivage pour les convertases des proprotéines telles les subtilisines des mammifères (SPC2 ou SPC3). De plus, la prépro-NC contient au moins deux autres peptides qui sont flanqués par des sites potentiels de clivage (FLORIN *et al.*, 1997), à savoir la nocistatine et l'orphanine FQ2 dont on ne connaît pas encore les effets biologiques. La nocistatine et l'orphanine FQ2 sont composés respectivement de 29 et 17 acides aminés.

1.2 Localisation et distribution

1.2.1 NPY et ses homologues

Le NPY est distribué dans plusieurs organes et tissus en périphérie. Il a été retrouvé surtout dans les nerfs du système nerveux autonome et dans les plexus nerveux entourant les vaisseaux sanguins qui irriguent divers organes (SUNDLER *et al.*, 1983, 1986). Dans les terminaisons nerveuses du système nerveux sympathique, le NPY est stocké dans les synaptosomes, seul ou avec la NE. Dans d'autres fibres du système

nerveux autonome, il est aussi co-localisé avec d'autres neurotransmetteurs tels le peptide vasoactif intestinal (VIP), le peptide histidyl-isoleucine (PHI), des amines et l'acétylcholine (ACh) (FURNESS *et al.*, 1983; FORSGREN, 1989a, 1989b; CORR *et al.*, 1990).

Le PYY et le PP sont considérés comme des médiateurs endocriniens car ils sont surtout synthétisés et stockés dans les cellules endocrines respectivement de l'intestin et du pancréas. Dans le système nerveux central, le PYY est retrouvé dans certains neurones localisés dans la région du tronc cérébral (EKMAN *et al.*, 1986; BROMMÉ *et al.*, 1985) tandis que le PP semble être complètement absent dans le SNC.

C'est dans le système nerveux central que la concentration en NPY est la plus élevée. On le retrouve dans plusieurs régions du cerveau telles le cortex cérébral, l'hippocampe, le thalamus, l'hypothalamus et le tronc cérébral (DiMAGGIO *et al.*, 1985). Le NPY est retrouvé dans les corps cellulaires des neurones du noyau arqué de l'hypothalamus, du locus coeruleus et du noyau de tractus solitarius. Tandis que dans d'autres régions, comme l'hypothalamus, la région limbique et le tronc cérébral, le NPY est retrouvé dans les terminaisons nerveuses (CHRONWALL *et al.*, 1985; DeQUIDT et EMSON, 1986a, 1986b). La distribution différentielle du NPY dans le cerveau suggère que ce peptide pourrait être impliqué dans la régulation des fonctions cérébrales somatiques, sensorielles et cognitives.

1.2.2 Nociceptine

La NC est principalement retrouvée dans le système nerveux central. Elle est distribuée dans les mêmes régions que celle où sont concentrés les peptides opioïdes; lesquels sont surtout impliqués dans la modulation de la douleur. Cependant, la NC a

aussi été retrouvée dans des régions où les peptides opioïdes sont absents. La colocalisation de la NC et des peptides opioïdes dans un même neurone n'a pas été observée (RIEDL *et al.*, 1996). La distribution de l'ARNm du précurseur de la NC a été examinée chez l'homme et les rongeurs par des techniques de buvardage de type Northern et d'hybridation *in situ*. On a détecté une forte expression de ce précurseur dans la région de l'amygdale et dans le noyau sous-thalamique chez l'homme tandis qu'une expression modérée a été notée dans l'hypothalamus, la substance noire et le thalamus. Chez les rongeurs, des niveaux élevés d'ARNm pour la prépro-NC ont été trouvés dans plusieurs régions du cerveau, telles le septum latéral, l'hypothalamus antérieur et plusieurs noyaux du tronc cérébral (DARLAND et GRANDY, 1998; DARLAND *et al.*, 1998; NOTHACKER *et al.*, 1996). Dans plusieurs régions du cerveau, la présence de la NC dans les inter-neurones a été rapportée suggérant que la NC pourrait être impliquée dans des fonctions modulatrices des circuits locaux (IKEDA *et al.*, 1998). On a documenté la présence d'immunoréactivité apparentée à la NC au niveau des cornes dorsales de la moelle épinière, du noyau du trijumeaux et du tronc cérébral (RIEDL *et al.*, 1996), toutes des structures impliquées dans la modulation de la douleur.

En périphérie, il a été rapporté que la NC est absente dans plusieurs tissus et organes sauf dans l'ovaire (faible signal d'ARNm pour la prépro-NC) (MOLLEREAU *et al.*, 1996). Cependant, des effets pharmacologiques de la NC exogène ont été détectés dans plusieurs organes suggérant que la NC peut être synthétisée et libérée probablement à partir des fibres nerveuses innervant ces organes ou tissus

1.3 Clonage et distribution des récepteurs du NPY et de la NC

À l'heure actuelle, cinq récepteurs du NPY (Y_1 , Y_2 , Y_4 , Y_5 et y_6) ont été clonés et ce, chez plusieurs espèces animales dont le rat, le lapin, l'homme et la souris. Parmi les récepteurs couplés aux protéines G, la famille des cinq récepteurs du NPY est la plus divergente de point de vue de la structure primaire. La comparaison des séquences en acides aminés montre que les récepteurs de types Y_1 , Y_4 et y_6 ont plus de similarités entre eux et divergent des types Y_2 et Y_5 (LARHAMMAR, 1996). Par exemple, le type Y_1 a une homologie structurale en acides aminés de 42% et 51% avec respectivement les types Y_4 et y_6 et seulement de 35 et de 31% avec les récepteurs Y_5 et Y_2 . De plus, le type y_6 est atypique car il est fonctionnel seulement chez la souris et le lapin. Chez les primates, il est exprimé sous forme tronquée et ne semble pas être fonctionnel alors que chez le rat, il est complètement absent (GREGOR *et al.*, 1996b; MATSUMOTO *et al.*, 1996). À cause de ces particularités, on préfère pour l'instant, indiquer ce récepteur avec la lettre y en minuscule pour le différencier des autres récepteurs du NPY dont les fonctions sont mieux établies. Tous les récepteurs clonés du NPY ont jusqu'à présent été montré comme étant couplés aux protéines G de type G_i/G_o , i.e, celles qui inhibent l'adénylate cyclase. Il a été rapporté également que les récepteurs de types Y_1 et Y_2 sont capables d'augmenter la concentration de calcium intracellulaire (LARHAMMAR *et al.*, 1992; HERZOG *et al.*, 1992; GERALD *et al.*, 1995) indiquant que ces récepteurs peuvent être aussi couplés à d'autres types de protéine G.

À l'aide de techniques d'hybridation *in situ*, de buvardage de type Northern et de RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction), il a été montré que les récepteurs du NPY sont distribués à la fois dans plusieurs régions du système nerveux

central et dans les organes périphériques. Au niveau du SNC, on retrouve surtout les types Y_1 , Y_2 et Y_3 mais très peu de Y_4 et y_6 (DUMONT *et al.*, 2000; MICHEL *et al.*, 1998). En périphérie, le type Y_1 a été retrouvé dans le cœur, les vaisseaux sanguins, le rein et le système gastrointestinal (WHARTON *et al.*, 1993; NAKAMURA *et al.*, 1995). L'expression du récepteur Y_2 a été détecté dans le SNC mais, lorsqu'on examine le niveau d'ARNm de ce récepteur, il semble aussi être exprimé en périphérie. En fait, il a été montré que l'effet pharmacologique du NPY est spécifiquement relayé par le récepteur Y_2 dans plusieurs tissus et organes à savoir le vas deferens, les vaisseaux sanguins et le rein (ROSE *et al.*, 1995; GEHLERT *et al.*, 1996b; WAHLESTED *et al.*, 1986; WIELAND *et al.*, 1995). Le récepteur Y_3 a été décrit sur la base de données pharmacologiques. On a décrit des effets dans le cerveau et dans certains tissus périphériques (GRUNDEMAR *et al.*, 1991; DUMONT *et al.*, 1994; HIRABAYASHI *et al.*, 1996) cependant, malgré les efforts déployé par les biologistes moléculaires, le gène codant pour ce récepteur n'a pas encore été identifié. Ceci remet donc en question l'existence de ce récepteur comme entité bien définie. Le type Y_4 est présent surtout dans le côlon, le petit intestin, la prostate, le poumon et les testicules (LUNDELL *et al.*, 1995, 1996). Le récepteur Y_5 est exprimé surtout dans le SNC et très peu en périphérie sauf pour une faible expression dans les testicules (GERALD *et al.*, 1996; HU *et al.*, 1996). Par ailleurs, selon les données pharmacologiques obtenues avec certains agonistes, on a rapporté la présence dans le rein de sites fonctionnels qui s'apparente avec le récepteur de type Y_5 (BISCHOFF *et al.*, 1997). La caractérisation avec les antagonistes est requise pour valider cette hypothèse. Finalement, le type y_6 est distribué dans le cerveau, le petit intestin et le cortex des surrénales de lapin et de souris (WEINBERG *et al.*, 1996; MATSUMOTO *et al.*, 1996).

Le récepteur ORL₁, que nous identifierons avec l'abréviation OP₄ et ce, en accord avec CALO' *et al.* (2000b), est le seul récepteur de la nociceptine qui ait été cloné à ce jour; il est classé dans la famille des récepteurs opioïdes. Il ne semble pas y avoir de sous-types pour ce récepteur. Cependant, il a été démontré qu'il existe des variantes d'épissage alternatif au niveau d'ARNm chez le rat et la souris (PAN *et al.*, 1998; PELUSO *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1994b; WICK *et al.*, 1994, 1995; XIE *et al.*, 1999). Chez le rat, on a rapporté deux formes d'ARNm, longue et courte, qui sont différenciées au niveau post- transcriptionnel. Dans la forme longue, le troisième intron de l'ARN n'a pas été épissé. Ceci résulte en une insertion d'environ 17 résidus d'acides aminés dans la deuxième boucle extra-cellulaire; lesquels pourraient avoir un impact sur l'affinité du récepteur pour son ligand. Il a aussi été démontré que les deux isoformes d'ARNm n'ont pas la même distribution dans l'organisme et que dans le cerveau l'expression de la forme longue est prédominante sur la forme courte (XIE *et al.*, 1999). Cependant, les différences entre ces deux isoformes au point de vue profils pharmacologiques et rôles physiologiques n'ont pas encore été établies.

Le récepteur OP₄ possède plusieurs caractéristiques communes avec les récepteurs des opiacés. Il possède environ 60% d'homologie (en acides aminés) et environ 90% d'identité inter- espèces (homme, rat, souris et porc) (MOLLEREAU *et al.*, 1994; BUNZOW *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1994; LACHOWICZ *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1994b; NISHI *et al.*, 1994; OSINSKI *et al.*, 1999a). Plusieurs caractéristiques intramoléculaires des récepteurs opioïdes se retrouvent dans le récepteur OP₄, en particulier, les sites pour la N glycosylation, la palmitoylation et la phosphorylation par la PKC et la PKA. De plus, certains résidus cystéine dans les boucles intracellulaires sont également conservés (HARRISON et GRANDY, 2000). Le récepteur OP₄ est également

couplé aux protéines Gi/Go sensibles à la toxine pertussique et, sous l'action de la NC, il inhibe la production de l'adenylate cyclase (MEUNIER *et al.*, 1995), comme il en est le cas pour les récepteurs opioïdes.

La répartition du récepteur OP₄ dans l'organisme a été établie en marquant l'ARNm et la protéine membranaire. Dans le SNC, on retrouve le récepteur OP₄ et la NC distribués dans les mêmes régions que les autres récepteurs des opiacés qui sont impliqués dans le processus de douleur. Cependant, on a clairement rapporté que le récepteur OP₄ n'est pas co-localisé avec aucun des récepteurs des opiacés sur un même neurone, suggérant que le système NC/OP₄ peut avoir des fonctions différentes de celles des peptides opioïdes. Le récepteur OP₄ est exprimé en densité importante dans les régions suivantes : le cortex cérébral, le septum, l'amygdale, le thalamus, l'hypothalamus, l'hippocampe, le locus coeruleus, la corne dorsale de la moelle épinière et les ganglions dorsaux (BUNZOW *et al.*, 1994; DARLAND et GRANDY, 1998; FUKUDA *et al.*, 1994; LACHOWICZ *et al.*, 1995; MOLLEREAU *et al.*, 1994); toutes des structures où l'on retrouve aussi l'un ou l'autre types de récepteurs pour les opioïdes.

En périphérie, l'ARNm de l'OP₄ a été détecté dans la glande surrénale et le foie, tandis qu'il est absent dans le cœur, l'intestin, le rein, le poumon, l'ovaire, le pancréas, la rétine et la rate (LACHOWICZ *et al.*, 1995). La présence du récepteur OP₄ en périphérie a été mise en évidence par les activités biologiques que la NC induit, particulièrement dans l'intestin, les bronches et le vas deferens (RIZZI *et al.*, 1999a; NICHOLSON *et al.*, 1998; GUERRINI *et al.*, 1998) où l'activité biologique de la NC est très intense. Ceci indique que le récepteur OP₄ est exprimé et qu'il est fonctionnel en périphérie et conséquemment, pourrait être impliqué dans diverses fonctions des systèmes digestif, reproductif et respiratoire.

1.4 Effets biologiques du NPY et de la NC

1.4.1 Effets centraux

Plusieurs études ont été effectuées pour déterminer les rôles physiologiques du NPY et de ses congénères dans le SNC et une variété d'effets centraux sont maintenant documentés dans plusieurs articles de revues (DUMONT et al., 1992; KALRA and CROWLEY, 1992; GRUNDEMAR et al., 1993; WAHLESTEDT and REIS, 1993; COLMERS and BLEAKMAN, 1994; GEHLERT, 1998; HEILIG and WIDERLOV, 1995; MUNGLANI et al., 1996). Lorsque le NPY et ses congénères sont injectés dans les ventricules cérébraux ou dans les noyaux paraventriculaire et préformical de l'hypothalamus, ils produisent des effets hyperphagiques puissants chez plusieurs espèces animales incluant le rat, le mouton, le porc, le lapin, la souris et le pigeon (QUIRION et al., 1990; STANLEY and LEIBOWITZ, 1984; MINER et al., 1989; PARROTT et al., 1986; PAU et al., 1988; KUENZEL and McMURTY, 1988). Il a été rapporté que le NPY et le PYY sont aussi impliqués dans d'autres fonctions cérébrales dont plus spécialement le processus de mémoire, la locomotion, les fonctions cardio-respiratoires, l'activité sexuelle, la température corporelle et l'anxiété (HARFSTRAND, 1986; HAAS et al., 1987; FLOOD et al., 1987; HEILIG and MURISON, 1987; COLMERS, 1990; JOLICOEUR et al., 1991; HEILIG et al., 1993; COLMERS and BLEAKMAN, 1994). De plus, les sécrétions de certaines hormones comme le LHRH, le CRF, le GH, la prolactine et la thyrotropine peuvent être régulées par le NPY (HARFSTRAND et al., 1986; TSAGARAKI et al., 1989; KALRA and CROWLEY, 1984, 1992). De façon générale, le NPY agit comme un neuro- modulateur dans le SNC.

La nociceptine exerce aussi plusieurs effets biologiques importants dans le SNC. Étant donné que la NC est distribuée dans les mêmes régions que les opiacés, plusieurs études ont montré que la NC interfère aussi avec le processus de douleur (MEUNIER *et al.*, 1995; REINSCHIED *et al.*, 1995). La NC exerce des effets complexes dans le mécanisme impliquant la douleur. Dépendant du site d'injection, la NC peut augmenter ou diminuer le seuil de douleur ou même produire des effets analgésiques similaires à ceux des peptides opioïdes. En fait, il a été montré que lorsqu'administrée par voie i.c.v., la NC produit une hyperalgésie (MEUNIER *et al.*, 1995); inhibe les effets analgésiques des opiacés (morphine) et réduit les effets analgésiques du stress et de l'électroacupuncture (MOGIL *et al.*, 1996; TIAN *et al.*, 1997). Par contre, lorsqu'administrée par voie intrathécale, la NC induit des effets analgésiques. Plusieurs études ont montré que l'action de la NC au niveau de la moelle épinière (analgésie) est sensible à la naloxone (ERB *et al.*, 1997; KING *et al.*, 1997; CANDELETTI *et al.*, 1998; HAO *et al.*, 1998; BERTORELLI *et al.*, 1999; KAMEI *et al.*, 1999). Ces données suggèrent que la NC agit via des mécanismes d'action différents dans les deux parties du SNC, encéphale et moelle épinière. Une autre explication possible est que les récepteurs de la NC seraient exprimés dans des neurones qui n'ont pas les mêmes fonctions dans les deux parties du cerveau.

Quelques études intéressantes ont aussi montré que la tolérance à la morphine administrée de façon chronique chez la souris, est réduite de 50% lorsque le gène codant pour la prépro-NC est supprimé (TIAN *et al.*, 1998; UEDA *et al.*, 1997). Des observations similaires ont été rapportées dans le modèle de dépendance et de tolérance évoquées par l'électro-acupuncture chez la souris traitée aux anticorps dirigés contre la

NC (UEDA *et al.*, 1997). Ces observations suggèrent que la NC endogène peut favoriser la tolérance et la dépendance aux opiacés.

À l'heure actuelle, la NC et le NPY sont des neuropeptides de familles bien distinctes et ont été étudiés séparément. Cependant, plusieurs données de la littérature semblent indiquer que ces deux peptides exercent plusieurs effets similaires au niveau du SNC. Un des plus importants effets centraux noté est celui du contrôle de la prise de nourriture. Le NPY a été considéré comme un puissant agent stimulant de la prise de nourriture chez les animaux, lorsqu'administré dans le ventricule cérébral. Les études récentes ont démontré que la NC, lorsqu'administrée par voie i.c.v, stimule la consommation de nourriture de façon significative (POMONIS *et al.*, 1996; CANDELETTI et FERRI, 1998). Des effets hyperphagiques des deux peptides sont inhibés par la naloxone, suggérant que les deux peptides stimulent les voies des peptides opioïdes (POMONIS *et al.*, 1996; RUDSKI *et al.*, 1996). Il faut cependant ajouter que la NC exerce des effets sur la consommation de nourriture qui varient selon l'état de satiété de l'animal, i.e., elle l'augmente chez les animaux préalablement nourris tandis qu'elle la diminue chez les rats tenus au jeûne (CANDELETTI et FERRI, 1998). Par contre, l'hyperphagie induite par le NPY ne semble pas être affectée par ces conditions particulières. Par ailleurs, il a été démontré dans des études indépendantes que la NC et le NPY stimulent l'appétit en agissant dans les mêmes noyaux du SNC notamment le nucleus accumbens et l'hypothalamus ventromédial suggérant que les récepteurs du NPY et de la NC sont co-localisés (SHIBASAKI *et al.*, 1993; WALTER *et al.*, 1994; STRATFORD *et al.*, 1997). Cependant, ceci reste à être démontré. La NC exerce d'autres effets centraux semblables à ceux du NPY quoique les interactions entre ces deux peptides au niveau du SNC n'ont pas encore été établies. On a rapporté que ces

deux peptides peuvent exercer des effets sur la locomotion, l'anxiété, l'apprentissage, le contrôle du système cardiovasculaire et la mémoire (CARTER *et al.*, 1985; FLOOD *et al.*, 1987; HEILIG and MURISON, 1987; TSENG *et al.*, 1988; MANABE *et al.*, 1998; KUBO *et al.*, 1990; GRUNDEMARE *et al.*, 1991; HEILIG *et al.*, 1993; REINSCHIED *et al.*, 1995; KAPUSTA *et al.*, 1997; JENCK *et al.*, 1997; SANDIN *et al.*, 1997), mais les sites d'action et la co-localisation des récepteurs pour ces deux peptides dans des régions spécifiques n'ont pas encore été élucidés. Beaucoup restent donc à faire pour établir l'existence d'interactions (positives ou négatives) entre les deux systèmes peptidergiques au niveau du SNC.

1.4.2 Effets périphériques

La vaste distribution du NPY et de ses homologues (PYY et PP) en périphérie suggère que ces peptides pourraient exercer divers effets biologiques sur plusieurs organes ou tissus. À cet effet, il a été rapporté que le NPY influence la relâche des neurotransmetteurs et hormones, contracte les vaisseaux sanguins, module la motilité ou/et les sécrétions gastrointestinales et les fonctions du tubule rénal proximal (SHEIKH, 1991; WANG *et al.*, 1994a; MICHEL and RASCHER, 1995; LUNDBERG, 1996; PLAYFORD *et al.*, 1996). Dans le système gastrointestinal, le NPY et ses homologues inhibent la sécrétion exocrine biliaire, gastrique et pancréatique ainsi que la motilité intestinale (HAZELWOOD, 1993), probablement en inhibant la relâche de neurotransmetteurs (e.g. la NE à partir des neurones du système nerveux sympathique).

Au niveau du système cardio-vasculaire, le NPY induit des effets vasoconstricteurs de longue durée (WAHLESTEDT *et al.*, 1986) qui dérivent de trois actions à savoir : 1) une contraction des muscles lisses vasculaires, 2) une potentialisation

au niveau post-jonctionnel des effets vasoconstricteurs d'autres neurotransmetteurs (e.g. la NE) et 3) une inhibition de la relâche de certains agents vaso-relaxants (e.g. l'ACh) (LUNDBERG *et al.*, 1985; CORDER *et al.*, 1987; PERNOW et LUNDBERG, 1988; HAIR *et al.*, 1988; EDVINSSON *et al.*, 1989).

Au niveau du cœur, le NPY exerce des effets inotropes et chronotropes positifs qui seraient dus à une modulation de la relâche de NE, d'ACh ou de d'autres neurotransmetteurs à partir des nerfs sympathiques, du nerf vague et des nerfs sensoriels (POTTER, 1985; 1987; POTTER *et al.*, 1989; GIULIANI *et al.*, 1989; HAASS *et al.*, 1989). Ces mêmes mécanismes seraient aussi effectifs au niveau du poumon (MATRAN *et al.*, 1989; STRETTON *et al.*, 1990).

Tel que mentionné plus haut, l'expression de la NC serait peu détectable dans la plupart des tissus et organes périphériques, cependant, on a pu mettre en évidence l'existence d'effets pharmacologiques induits par la NC dans plusieurs organes. En fait, la NC exerce des effets plutôt inhibiteurs qui peuvent être exprimés soit en terme de relaxations (e.g. vas deferens) ou en terme de contractions (e.g. côlon). Ces effets ont été décrits et discutés dans plusieurs articles de revue récents (HENDERSON et McKNIGHT, 1997; MEUNIER, 1997; TAYLOR et DICKENSON, 1998; DARLAND *et al.*, 1998; CALO *et al.*, 2000b). Dans le système gastrointestinal, la NC exerce des effets similaires à ceux du NPY. Les deux peptides inhibent la motilité, bloquent le transport actif des anions dans la muqueuse et induisent des contractions de certaines segments de l'intestin tels les côlons. Des effets inhibiteurs de la NC ont été aussi observés dans les systèmes respiratoire, cardio-vasculaire et reproductif. La plupart du temps, la NC inhibe les contractions des tissus stimulés électriquement tel les bronches et les vas deferens (FISCHER *et al.*, 1998, GUERRINI *et al.*, 1998; OKAWA *et al.*, 1999), suggérant que ce

peptide interfère (inhibe) avec la relâche de neurotransmetteurs dans ces tissus. Dans le vas deferens de plusieurs espèces, la NC exerce les mêmes effets que le NPY tels l'inhibition de la contraction stimulée par des impulsions électriques. Ceci montre que ces deux peptides peuvent agir via le système nerveux autonome.

Lorsqu'injectée par voie intraveineuse chez le rat, la NC produit une hypotension et une bradycardie, contrairement au NPY. Ces effets semblent découler d'une action de la NC au niveau du système nerveux autonome (GIULIANI *et al.*, 1997) car la NC ne possède pas de récepteurs sur les muscles lisses vasculaires, contrairement au NPY. Les effets hypotenseurs peuvent aussi être obtenus en injectant la NC au niveau central (KAPUSTA *et al.*, 1997), indiquant que ce peptide peut interférer avec les fonctions des nerfs efférents qui sont responsables du contrôle de la pression sanguine systémique. Par ailleurs, KAPUSTA *et al.* (1997) ont montré que la NC produit une augmentation de l'excrétion d'eau qui n'est pas accompagnée par une natriurèse et qui dépend de l'inhibition de la sécrétion d'ADH. De façon générale, on peut donc affirmer que les deux peptides exercent les mêmes effets sur les neurones, tandis que l'existence de récepteurs du NPY dans des cellules non neuronales serait à la base des différences entre les effets des deux peptides sur la circulation.

2. SITES RÉCEPTORIELS

2.1 Historique

La subdivision des récepteurs du NPY en divers sous-types a commencé en 1986 lorsque WAHLESTEDT et ses collaborateurs (WAHLESTEDT *et al.*, 1986) ont observé que les fragments C-terminaux du NPY ou du PYY pouvaient inhiber la contraction du

vas deferens de rat stimulé électriquement mais n'induisaient aucune contraction sur la veine iliaque de cobaye. Ils ont alors proposé que le récepteur qui est activé seulement par la molécule entière du NPY ou du PYY serait de sous-type Y_1 et l'autre récepteur qui répond soit aux molécules mères soit aux fragments C-terminaux du NPY ou de PYY serait de sous-type Y_2 . Les fragments synthétiques utilisés pour caractériser ces deux récepteurs ont été initialement le PYY₁₃₋₃₆ et le NPY₁₃₋₃₆. Quelques années plus tard, d'autres groupes de chercheurs ont observé que certains des longs fragments C-terminaux endogènes (voir ci-dessus) de ces peptides étaient actifs sur le récepteur de type Y_2 mais non sur le Y_1 (EBERLEIN *et al.*, 1989; GRANDT *et al.*, 1992,1996). Cette première démonstration de l'existence de sous-types différents de récepteurs pour le NPY a été confirmée par plusieurs études subséquentes. Il y a eu d'abord le développement d'agonistes sélectifs pour le récepteur Y_1 , à savoir le [Leu³¹, Pro³⁴]NPY et le [Pro³⁴]NPY (FUHLENDORFF *et al.*, 1990; GRANDT *et al.*, 1994); par la suite, on a découvert des antagonistes sélectifs du récepteur Y_1 et finalement, on a cloné les gènes pour deux récepteurs, le Y_1 et le Y_2 , ce qui a permis de confirmer l'existence moléculaire des deux entités pharmacologiques distinctes.

Un troisième type de récepteur, le Y_3 , fut proposé uniquement sur la base de certaines réponses biologiques atypiques au NPY et au PYY. Le Y_3 semble reconnaître préférentiellement la molécule de NPY (GRUNDEMAR *et al.*, 1991; DUMONT *et al.*, 1994; HIRABAYASHI *et al.*, 1996) mais, son existence est circonstancielle car il n'a pas encore été cloné et aucun antagoniste ou agoniste sélectif n'a été développé pour ce récepteur. Depuis quelques années, au moins trois autres types de récepteurs pour le NPY ont été clonés et caractérisés, à savoir, le Y_4 , le Y_5 et le y_6 . Ces récepteurs présentent des profils pharmacologiques bien distincts en terme d'affinités relatives pour le NPY et ses

congénères; profils pharmacologiques que nous décrirons dans la section “Classification des récepteurs”.

L'histoire du récepteur de la NC a commencé en 1992 quand le premier récepteur des peptides opioïdes, le δ (OP₁), a été cloné (EVANS *et al.*, 1992; KIEFFER *et al.*, 1992). On a par la suite cloné le récepteur κ et μ (OP₂, OP₃) (CHEN *et al.*, 1993; YASUDA *et al.*, 1993). Avec la technique de la biologie moléculaire et en utilisant les sondes oligonucléotides construites à partir des séquences consensus des récepteurs opioïdes, plusieurs groupes de chercheurs ont identifié un nouveau type de récepteur qui ne reconnaît aucun agoniste opioïde connu et qui a été considéré pendant une courte période comme un récepteur orphelin (BUNZOW *et al.*, 1994; FUKUDA *et al.*, 1994; MOLLEREAU *et al.*, 1994; NISHI *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1994b). Ce récepteur a été désigné sous différents noms, à savoir : ORL₁, LC132, XOR, Hyp8-1, C3, ROR-C, Ratxor1 et KOR-3 (HARRISON et GRANDY, 2000). L'appellation ORL₁ (Opiode Receptor Like) a été conservée jusqu'au moment où une nouvelle abréviation (OP₄) soit proposée pour uniformiser la nomenclature des récepteurs opioïdes proposé initialement par CALO *et al.*, (2000) et DHAWAN *et al.* (1996).

2.2 Rôles physiologiques proposés pour les systèmes du NPY et du NC/ORL₁: implications en physiopathologie

Les effets biologiques multiples qu'exercent le NPY et la NC *in vitro* et *in vivo* ont contribué à préciser les rôles et les implications multiples de ces peptides en physiologie et en pathologie. Il a été rapporté que les concentrations du NPY dans le sang et le liquide céphalo- rachidien (CSF) augmente de façon significative chez les patients souffrant d'obésité, de dépression grave et d'hypertension essentielle

(WIDERLOV *et al.*, 1988; WAHLESTEDT *et al.*, 1989, 1986; ADERSON *et al.*, 1989; WIDDOWSON *et al.*, 1992; WAHLESTEDT et REIS, 1993). Ces observations suggèrent que le NPY et ses récepteurs sont potentiellement impliqués dans l'étiologie de l'obésité et/ou l'anorexie et certains désordres psychiques et neurologiques et même dans l'hypertension essentielle.

Les taux de NC endogène n'ont pas encore été mesurés chez l'homme. Bien que les rôles physiologiques potentiels de la NC et du récepteur OP_4 au niveau central et en périphérie ne soient pas encore élucidés, on peut envisager des implications du système NC/ OP_4 dans des maladies et syndromes neurologiques tels l'anxiété, l'obésité ou l'anorexie, la douleur chronique, la tolérance et la dépendance aux narcotiques, l'épilepsie ainsi que dans le contrôle de l'équilibre hydro-électrolytique (CALO *et al.*, 2000b).

À fin d'élucider les rôles physiologiques et les implications en physiopathologie de la NC, du NPY et de leur récepteurs, plusieurs approches expérimentales peuvent être utilisées. Les trois approches suivantes ont été couramment utilisées pour investiguer sur les contribution potentielle des hormones peptidiques dans des condition *in vivo* : 1) l'utilisation d'outils pharmacologiques spécifiques et sélectifs pour les récepteurs, 2) la suppression permanente de gènes codant soit pour le récepteur ou pour le ligand et 3) l'utilisation d'anticorps pour neutraliser le ligand ou d'oligonucléotides antisenses pour bloquer l'expression du ligand ou d'un récepteur. Bien que les deux dernières approches semblent être plus spécifiques et sélectives, elles sont plutôt laborieuses et ne permettent pas nécessairement d'élucider tous les rôles et implications en physiopathologie des hormones. Par exemple, la suppression d'un gène spécifique ne présente d'impact que sur certaines réponses physiologiques et non sur d'autres comme il a déjà été rapporté pour le NPY et la NC, probablement à cause du phénomène compensatoire. La

suppression du gène codant pour le NPY chez la souris n'a aucune influence sur la prise de nourriture, mais par contre augmente la sensibilité de l'animal aux attaques épileptiques évoquées par l'acide kainique (BARABAN *et al.*, 1997; HOLLOPETER *et al.*, 1998). Par ailleurs, la suppression du gène pour le récepteur OP_4 chez la souris n'a aucune répercussion ni sur le seuil de la nociception mesuré dans différents tests ni sur le comportement d'anxiété. Cependant, on a rapporté que l'apprentissage spatial serait stimulé chez ces souris dépourvues du récepteur OP_4 (MAMIYA *et al.*, 1998). Par contre, on peut constater que l'utilisation d'agents pharmacologiques spécifiques et sélectifs s'avère être une approche directe et réversible pour cerner la complexité des fonctions des systèmes peptidergiques *in vivo* et *in vitro*. C'est cette dernière approche que nous avons adopté dans le travail qui est illustré dans cette thèse.

2.3 Classification des récepteurs du NPY et de la NC

2.3.1 Récepteurs du NPY

La classification des récepteurs du NPY a été, avant tout, basée sur les effets générés par différents agonistes. Tel que décrit ci-haut, les deux premiers types de récepteurs du NPY à être identifiés ont été le Y_1 et Y_2 . Le type Y_1 reconnaît préférentiellement les molécules entières du NPY et du PYY, tandis que le type Y_2 est capable de lier les molécules mères et de longs fragments C-terminaux du NPY et du PYY (WAHLESTEDT *et al.*, 1986). Depuis le clonage de plusieurs nouveaux types de récepteurs du NPY, la classification pharmacologique fondée sur les agonistes est devenue insuffisante faute de sélectivité de ces derniers composés. À l'heure actuelle, seulement quelques agonistes et antagonistes sélectifs sont disponibles pour les récepteurs

Tableau # 3

Caractéristiques des différents récepteurs clonés du NPY

	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	y6
Clone	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Oui
Signal de transduction	Gi/o (inhibition adénylate cyclase)	Gi/o (inhibition adénylate cyclase)	?	Gi/o (inhibition adénylate cyclase)	Gi/o (inhibition adénylate cyclase)	(inhibition adénylate cyclase)
Agoniste naturel	NPY, PYY>PP	NPY, PYY>PP	NPY>PYY	PP>NPY≈PYY	NPY≈PYY≈PP	NPY≈PYY>PP?
Agoniste sélectif	[L,P]NPY [L,P]PYY	NPY(13-36) NPY(2-36) PYY(3-36)	?	?	NPY(2-36) PYY(3-36)	?
Antagoniste sélectif	BIBP3226 GR23118	T4[NPY₃₃₋₃₆]₄ BIIE246	?	?	CGP71683A	?

[L,P]: [Leu³¹, Pro³⁴]

du NPY. Le tableau 3 résume les données concernant le profil pharmacologique de chacun des récepteurs du NPY; profil pharmacologique basé sur les affinités relatives de divers agonistes et antagonistes (BLOMQVIST et HERZOG 1997; MICHEL *et al.*, 1998). Les types Y_1 , Y_2 , Y_4 , Y_5 et y_6 , tous reconnaissent le NPY et le PYY comme agonistes naturels. Seulement les types Y_5 et surtout le Y_4 sont capables de lier le PP. Le $[Leu^{31}, Pro^{34}]NPY$ et le $[Pro^{34}]NPY$; deux agonistes synthétiques initialement considérés comme sélectifs pour le récepteur Y_1 , sont maintenant connus pour aussi interagir avec les récepteurs Y_4 et Y_5 (GERALD *et al.*, 1996). Les fragments en C-terminal du NPY et du PYY, considérés antérieurement comme agonistes sélectifs du récepteur Y_2 , sont reconnus aussi par le récepteur Y_5 . Il est évident que d'autres outils pharmacologiques plus sélectifs que ceux mentionnés ci-haut sont requis pour caractériser les récepteurs du NPY tant dans des conditions *in vitro* et *in vivo*. Pour l'instant, le récepteur Y_1 du NPY est le mieux caractérisé et ce, grâce à la disponibilité de quelques antagonistes pseudopeptidiques et non peptidiques ayant une bonne sélectivité et affinité pour ce dernier. Récemment, le récepteur Y_2 a été caractérisé à l'aide d'un nouvel antagoniste sélectif non peptidique soit le BIIE246 (DOODS *et al.*, 1999). Quelques composés antagonistes déjà publiés et plusieurs autres annoncés par des brevets sont disponibles pour le récepteur Y_5 , tandis que rien de sélectif n'est encore disponible pour les récepteurs Y_4 et y_6 . Dans la présente étude, nous avons caractérisé les effets pharmacologiques de divers composés antagonistes sur les préparations sélectionnées, pour procéder à une classification précise des récepteurs du NPY qui sont exprimés dans divers tissus et organes périphériques.

Tableau # 4

Caractéristiques des différents récepteurs clonés des peptides opioïdes

Nouveau nom	OP1	OP2	OP3	OP4
Ancien nom	δ	κ	μ	ORL-1
Clone	Oui	Oui	Oui	Oui
Signal de transduction	Gi/o (inhibition denylate cyclase)	Gi/o (inhibition denylate cyclase)	Gi/o (inhibition denylate cyclase)	Gi/o (inhibition adenylate cyclase)
Agoniste naturel	enkephaline	dynorphine	endorphine endomorphine	nociceptine
Agoniste sélectif	DPDPE	U69593	DAMGO	NC(1-13)NH₂
Antagoniste sélectif	Natrindole	Nor-BNI	CTOP	[Nphe1]NC(1-13)NH₂
Antagoniste non sélectif	Naloxone	Naloxone	Naloxone	?

DPDPE : H-Tyr-c(D-Pen-Gly-Phe-D-Pen)-OH

U69593: (5α, 7α, 8β)-(-)-N-methyl-2-phenyl-N-[pirrolidin-1-yl]-1-oxaspiro-4,5-dec-8-yl]-phenyl-acetamide

DAMGO: H-Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Gly-ol

CTOP: H-D-Phe-c(Cys-Thr-D-Trp-Om-Thr-Pen)-Thr-NH₂

Nor-BNI: 17,17'-bis(cyclopropylmethyl)-6-6',7,7'-tetra-dehydro-4,5α4', 5'α-diepoxy-6,6'-imino-7,7'-bimorphinan-3,3',14,14'-tetrol.

2.3.2 Récepteur de la NC

Le récepteur OP₄ de la nociceptine appartient à la famille des récepteurs opioïdes, mais il reconnaît uniquement la NC comme ligand naturel. Dans le Tableau 4 nous avons résumé les caractéristiques des quatre récepteurs opioïdes connus. Il est évident que des outils pharmacologiques sélectifs sont disponibles pour les récepteurs OP₁, OP₂ et OP₃, tandis que pour l'OP₄, nous disposons de quelques agonistes à savoir la NC, la NC(1-13)NH₂ et la NC-NH₂ (GUERRINI *et al.*, 1997; CALO *et al.*, 1998a; VARANI *et al.*, 1998). Ces agonistes ne présentent aucune activité sur les récepteurs classiques des opiacés. Le naloxone, qui est un antagoniste universel des récepteurs opioïdes, et tous les agonistes des opioïdes présentés dans le tableau 4 ont très peu ou aucune activité sur le récepteur OP₄. À l'heure actuelle, plusieurs laboratoires sont en train de développer des antagonistes non peptidiques pour le récepteur OP₄ et seule une molécule peptidique, qui d'ailleurs possède une faible affinité, le [Nphe¹]NC(1-13)NH₂ a été décrite (RIZZI *et al.*, 1999b; CALO *et al.*, 2000b). La caractérisation de récepteur de la NC à l'aide de cette molécule semble indiquer que la NC et ses dérivés agissent sur un seul type de récepteur.

Très peu de préparations pharmacologiques *in vitro* ont été développées pour étudier la pharmacologie des récepteurs du NPY et de la NC alors, la caractérisation des nouveaux composés synthétiques a été réalisée surtout sur des cultures de cellules transfectées. En dépit de la sensibilité élevée de ces préparations, les récepteurs exprimés dans ces systèmes sont souvent surexprimés et leur couplage aux seconds messagers de la cellule hôte est parfois déficitaire : le couplage peut être inapproprié ou différent de celui présent chez les cellules natives (MORGHE et TRANQUILLO, 1995). Divers problèmes peuvent être rencontrés lorsqu'on utilise le système de transfection. Plusieurs exemples

décrivant les effets des agents pharmacologiques sur les récepteurs à 7DTM (domaines transmembranaires) ont été cités et discutés dans l'article de revue publié par KENAKIN (1996). Il a été précisé que les récepteurs exprimés dans des cellules hôtes pourraient avoir des stœchiométries anormales et/ou la présence ou absence de certaines composantes essentielles au système récepteuriel occasionnant ainsi un comportement aberrant qui risque de ne pas refléter des activités thérapeutiques importantes de certains médicaments (voir l'article de revue par KENAKIN, 1996). Alors, l'expression des récepteurs à 7DTM dans les cellules hôtes pourrait refléter un profil pharmacologique qui n'est toujours pas fidèle à celui des récepteurs natifs à cause de l'organisation intrinsèque du système cellulaire (NEER, 1995). Les essais sur des organes isolés nous permettent de travailler avec les récepteurs natifs, d'étudier des récepteurs exprimés dans différents types cellulaires et dans différentes espèces et d'élucider les rôles et fonctions de ces récepteurs dans certains organes. En utilisant différents outils pharmacologiques, il est possible d'élucider le mécanisme d'action des peptides dans les tissus isolés et ceci permet d'établir les interactions entre les fibres musculaires et d'autres cellules environnantes (neurones). De plus, ces essais permettent d'évaluer rapidement les effets pharmacologiques de divers composés naturels ou synthétiques et d'établir la correspondance ou non entre les données obtenues sur des récepteurs transfectés et celles obtenues de préparations contenant des récepteurs natifs.

3. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

L'objectif principal de la présente étude a été la recherche de nouveaux essais biologiques pour la caractérisation des récepteurs de deux neuropeptides, le neuropeptide Y (NPY) et la nociceptine (NC). Nous avons choisi de travailler avec les récepteurs

natifs que l'on retrouve dans les vaisseaux et autres tissus d'animaux de laboratoire, particulièrement la souris, le rat, le cobaye et le lapin. Nous avons cependant exploré aussi les tissus vasculaires du chien grâce à une collaboration fructueuse et pluri-annuelle que nous poursuivons avec la société de protection des animaux de l'Estrée (SPA). Un deuxième objectif a été celui de mettre au point des préparations qui avaient déjà été utilisées auparavant pour mieux les caractériser à la lumière d'observations récentes et de composés nouveaux, particulièrement d'antagonistes. Le côlon de rat est une des préparations qui entre dans cette deuxième catégorie.

L'ensemble des données qui font partie de cette thèse a donc été obtenu à l'aide de tissus isolés, en utilisant la méthode classique de l'incubation de bandelettes de vaisseaux sanguins ou de segments d'intestin ou des vas deferens de diverses espèces animales dans des bains à organes isolés. Les publications qui constituent le corps de cette thèse portent : a) sur deux nouvelles préparations pharmacologiques identifiées et caractérisées au cours du présent travail, à savoir la veine saphène de chien (Y_2) et l'iléon de lapin (Y_4 , Y_5 , $y_6?$); b) le côlon de rat, une préparation décrite comme un système récepteuriel de type Y_3 , avant la démonstration de la présence de 2 sites fonctionnels pour le NPY; à savoir les récepteurs Y_2 et Y_4 . Les trois nouveaux récepteurs (Y_4 , Y_5 , y_6) qui ont été identifiés, clonés et caractérisés seulement en 1996 (GERALD et al., 1996; MICHEL *et al.*, 1998) et qui n'ont pas pu être considérés dans les premières publications portant sur le Y_3 , mais ceci a été possible dans le présent travail. Enfin, trois autres préparations déjà connues (les vas deferens de rat et de lapin et la veine saphène de lapin) ont été utilisées à titre comparatif et pour déterminer davantage la sélectivité et la spécificité de leurs réponses au NPY à l'aide de nouveaux antagonistes.

Trois articles (Pheng et al., Eur. J. Pharmacol. 1997a; Pheng et al., Eur. J. Pharmacol. 1997b et Pheng et al., Eur. J. Pharmacol. 1999) portent sur le NPY.

L'ensemble des données obtenues avec ce peptide, ses dérivés de synthèse et homologues ont été revues et discutées dans deux articles de revue (Pheng et al., *Regulatory Peptides* 1999 et Pheng et Regoli., *Life Sci.* 2000). Seul le deuxième est présenté dans cette thèse, car il contient une révision critique récent de toutes les données obtenues dans le domaine du NPY.

Deux articles (Pheng et al., Eur. J. Pharmacol. 2000a et Pheng et al., 2000b) contiennent les données les plus récentes obtenues avec la nociceptine et ses congénères; un travail réalisé en collaboration avec un groupe de chercheurs de l'Université de Ferrara en Italie. Deux des préparations mises au point au cours de l'étude sur le NPY ont présenté des réponses robustes et bien quantifiables à la NC. L'utilisation de deux préparations qui montrent une bonne sensibilité au NPY et à la NC et qui répondent à ces peptides par une relaxation (l'iléon de lapin) et par une contraction (le côlon descendant de rat), nous a permis d'approfondir quelque peu les mécanismes par lesquels les deux neuropeptides influencent les fonctions intestinales. Ces connaissances, nous l'espérons, pourront être utiles pour l'identification de nouveaux agents capables d'influencer et moduler les fonctions intestinales et l'appétit, particulièrement le péristaltisme (Nociceptine/Opiode) et la prise de nourriture (NPY et NC et leurs congénères).

RÉSULTATS

ARTICLE 1

*The dog saphenous vein: a sensitive and selective preparation for the Y2 receptor of
neuropeptide Y*

Pheng, L.H., Fournier, A., Dumont, Y., Quirion, R. & Regoli, D. Eur. J. Pharmacol. 327 :
163-167, 1997a.

Sommaire :

La recherche de nouvelles préparations pour l'étude des récepteurs du NPY a commencé par une étude systématique de vaisseaux de diverses espèces animales. Nous avons focalisé notre attention sur les vaisseaux artériels et veineux du chien et l'étude nous a porté à l'identification d'une préparation, la veine saphène, très sensible au NPY et à ses congénères. Ce tissu répond au NPY par une contraction dépendante de la concentration et la réponse se maintient assez stable, de sorte qu'il est possible de générer des courbes concentration-réponse cumulatives avec les peptides apparentés au NPY. La caractérisation de la réponse contractile et du site fonctionnel impliqué dans cette réponse a été poursuivie en utilisant des agonistes et des antagonistes de façon à pouvoir utiliser les critères de classification des récepteurs suggérés par Schild (SCHILD, 1973). Le profil pharmacologique que nous avons obtenu en utilisant plusieurs peptides apparentés au NPY nous a suggéré que cette préparation possède un récepteur de type Y_2 , étant donné que l'ordre de puissance des agonistes est le suivant :

$PYY \approx NPY(2-36) \approx PYY(3-36) \approx NPY \approx NPY(13-36) \gg [Leu^{31}, Pro^{34}]NPY > PP$.

De plus, ce profil pharmacologique obtenu ressemble à celui observé chez le vas deferens de rat, mais diffère de celui obtenu chez la veine saphène de lapin qui notamment est un système de type Y_1 . Cette hypothèse a été validée par l'utilisation d'un nouveau composé antagoniste de type Y_2 , le BIIE0246 (DUMONT *et al.*, 2000). Ce composé a significativement réduit les réponses engendrées par le NPY, le PYY et le $[Leu^{31}, Pro^{34}]NPY$, tandis que l'antagoniste sélectif du récepteur Y_1 le BIBP3226 s'est avéré complètement inactif.

Nos résultats indiquent que le récepteur Y_2 qui cause la contraction causée par le NPY sur la veine saphène de chien semble être localisé sur le muscle lisse vasculaire

étant donné que le NPY et ses congénères génèrent aussi des réponses contractile sur les veines dépourvues d'endothélium. Ainsi, à côté du site fonctionnel de type Y_2 qui est retrouvé sur les terminaison nerveuses sympathiques du vas deferens de rat et qui inhibe la libération de noradrénaline (WAHLESTED *et al.*, 1986), notre étude sur la veine saphène de chien, a permis d'identifier une préparation vasculaire, sensible et fiable qui permet d'évaluer l'action du récepteur Y_2 sur le muscle lisse vasculaire. Il s'agit d'une autre cible cellulaire localisée à proximité de la terminaison nerveuse sympathique du vas deferens de rat qui, jusqu'à date, a été la préparation de référence pour l'étude du récepteur Y_2 . L'effet contractile du NPY sur la veine saphène de chien se fait via une activation directe de son récepteur Y_2 spécifiquement localisé sur les muscles lisses. Ainsi, le NPY augmente la résistance vasculaire artérielle non seulement par un récepteur Y_1 , mais il augmente aussi le tonus des veines par l'intermédiaire de l'activation d'un récepteur de type Y_2 . Enfin, le NPY interagit aussi dans ce tissu, avec la cascade de l'acide arachidonique en stimulant la formation et la libération de prostaglandines lesquelles réduisent le tonus de la veine saphène de chien. L'utilisation de l'indométhacine, un inhibiteur de la cyclooxygénase, a permis d'induire une augmentation de l'intensité de la réponse contractile générée par le NPY en éliminant l'interférence des prostanoïdes. Cette nouvelle préparation nous a donc permis de mettre en évidence un autre site (mécanisme) d'action du NPY, qui, à coté de l'effet contractile relayé par le récepteur Y_2 , stimule la libération de prostanoïdes via un site récepteur qui se révèle de forte affinité pour le NPY mais qui n'a pas encore été caractérisé.

ARTICLE 2

The rabbit ileum: A sensitive and selective preparation for the neuropeptide Y Y₅ receptor

Pheng, L.H., Quirion, R., Iyengar, S., Fournier, A. & Regoli, D. Eur. J. Pharmacol.

333 (2-3): R3-R5, 1997b.

Sommaire :

Nous avons poursuivi notre recherche de nouvelles préparations pharmacologiques dans le but d'en identifier une pour l'étude des nouveaux récepteurs du NPY récemment clonés, le Y_4 , Y_5 et y_6 (GERALD et al., 1996; WEINBERG et al., 1996). Il a été démontré que le neuropeptide Y et ses homologues, le peptide YY et le polypeptide pancréatique inhibent certaines fonctions intestinales via probablement des récepteurs spécifiques (LARHAMMAR *et al.*, 1993). Dans cette étude, nous avons réalisé une intervention systématique sur plusieurs segments intestinaux provenant de différentes espèces animales et nous avons trouvé que l'iléon de lapin est une préparation sensible au NPY, au PYY et au PP. Lorsque suspendu dans la solution de Tyrode, sous une tension initiale de 1 g, l'iléon de lapin présente des activités spontanées régulières qui sont inhibées par le NPY, le PYY et surtout par le PP. La sensibilité de l'iléon de lapin au PP indique que cette préparation exprime des récepteurs du NPY de type autre que Y_1 et Y_2 .

Les activités spontanées et le tonus de base de l'iléon de lapin sont générés et maintenues par l'acétylcholine qui est relâchée continuellement à partir des neurones entériques puisque la tétródotoxine et l'atropine (utilisées à la concentration de 1 μ M) abolissent complètement ces activités. En présence de TTX ou d'atropine, les effets relaxants du PP et du PYY sont complètement éliminés, tandis que celui de la NE n'a pas été affecté, suggérant que le PP et ses congénères inhibent la relâche de l'acétylcholine via une activation de récepteurs localisés au niveau pré-jonctionnel. Ces récepteurs ont été caractérisés avec les agonistes et les antagonistes les plus puissants et le plus sélectifs connus à ce jour. Le profil pharmacologique suivant a été obtenu en utilisant comme agonistes divers homologues ou congénères du NPY:

hPP > PYY ≥ [Leu³¹, Pro³⁴]NPY > rPP > hNPY >> les fragments C-terminaux

Ce profil s'apparente à celui du récepteur Y₅ cloné à partir des tissus du rat (GERALD et al., 1996), mais il n'est pas totalement identique. Les différences retrouvées entre le récepteur du NPY de l'iléon de lapin et le récepteur Y₅ de rat sont : sur l'iléon de lapin, le NPY n'est qu'un agoniste partiel alors que le PYY(3-36) et le [D-Trp³²]NPY sont inactifs, tandis que sur le Y₅ de rat, ces peptides sont des agonistes complets. Ces différences nous portent à croire que le récepteur du NPY dans l'iléon de lapin n'est pas un type Y₅ pur tel que décrit dans la littérature, mais serait plutôt d'une variété encore inconnue ou constituerait en un mélange de récepteurs Y₅ et y₆.

Les effets biologiques du NPY et de ses congénères n'ont pas été affectés par le BIBP 3226, l'antagoniste du récepteur Y₁, mais sont inhibés par une forte concentration de JCF 104 (développé par GERALD et collaborateur en 1996), qui est considéré comme le premier antagoniste sélectif pour le récepteur du récepteur Y₅, impliqué dans le contrôle de l'appétit. A l'heure actuelle, des nouveaux antagonistes sélectifs du récepteur Y₅ sont disponibles. Nous les avons utilisé pour caractériser le récepteur du NPY présent dans l'iléon de lapin et les résultats obtenus avec ces nouveaux outils pharmacologiques sont décrits dans l'article de revue numéro 4 (voir cet article pour la suite de la discussion sur l'iléon de lapin).

ARTICLE 3

***Neuropeptide Y-induced contraction is mediated by neuropeptide Y Y₂ and Y₄ receptors in
the rat colon***

**Pheng, L.H., Perron, A., Quirion, R., Cadieux, A., Fauchère, J.L., Dumont, Y. & Regoli,
D.**

Eur. J. Pharmacol. 374 (1): 85-91, 1999.

Sommaire:

Une autre préparation intestinale que nous avons étudiée est le côlon de rat. Le côlon de rat a été utilisé antérieurement pour évaluer la pharmacologie du récepteur de type Y_3 du NPY. Étant donné que le gène codant pour le récepteur Y_3 n'a pas été identifié et que la classification de ce récepteur a été fondée uniquement sur la pharmacologie des agonistes du NPY, nous avons repris la caractérisation des récepteurs du NPY sur le côlon de rat en utilisant des nouveaux outils pharmacologiques plus spécifiques et plus sélectifs : entre autres des antagonistes.

Les segments de côlon ascendant et descendant de rat ont été utilisés dans cette étude. Le côlon transversal n'a pas été utilisé car il présente des fortes activités spontanées et a une faible sensibilité aux peptides de la famille du NPY. Le NPY et ses homologues évoquent des fortes contractions des côlons ascendant et descendant. Les réponses contractiles au NPY et aux peptides apparentés au NPY sont légèrement réduites par l'atropine, mais complètement abolies en présence de TTX. L'indométhacine, la diphényldramine ou la methysergide n'ont pas affecté les contractions induites par ces peptides. Ceci suggère que le NPY et ses congénères produisent des contractions du côlon descendant de rat via des décharges de médiateurs à partir de fibres nerveuses du plexus entérique. L'ordre de puissance des agonistes du NPY est le suivant :

$hPP=rPP > PYY(3-36)=[Leu^{31}, Pro^{34}]NPY > NPY(2-36) > C2-NPY = NPY > NPY(13-36)$

et on note une légère différence entre les deux parties du côlon. Ce profil ne correspond à aucun des profils pharmacologiques des récepteurs clonés du NPY. Le BIBP3226, l'antagoniste du récepteur Y_1 du NPY, n'a exercé aucun effet d'antagonisme. Cependant, l'antagoniste du récepteur Y_2 , le T4-[NPY(33-36)]4 et plus récemment le BIIE0246 (DUMONT *et al.*, 2000), ont réduit les effets du NPY, PYY, PYY(3-36) et du C2-NPY

sans affecter ceux du hPP, du rPP et du [Leu³¹, Pro³⁴]NPY. Le JCF104, l'antagoniste reconnu comme étant sélectif pour le récepteur Y₅, n'a produit aucun effet antagoniste contre le hPP ou le [Leu³¹, Pro³⁴]NPY sur cette préparation. L'ensemble des résultats suggèrent que le NPY et ses congénères induisent des contractions sur le côlon de rat par l'activation de récepteurs pré-jonctionnels modulant la relâche de l'acétylcholine et possiblement d'autres neurotransmetteurs. De plus, une proportion de récepteurs relayant la réponse contractile du côlon de rat au NPY et aux peptides apparentés au NPY semblent être de type Y₂ et une portion importante des réponses est produite par le récepteur insensible aux antagonistes des récepteurs Y₁, Y₂ et Y₅. Ce récepteur s'apparente au type Y₄ et semble être localisé aussi sur les nerfs entériques. Voir l'article de revue numéro 4 pour la suite de la discussion sur le côlon de rat.

ARTICLE 4

Receptors for NPY in peripheral tissues: Bioassays

Pheng, L.H. & Regoli, D.

Life Sci. 67 (8): 847-862, 2000.

Sommaire :

Cet article de revue décrit les résultats de différentes études comparatives de la pharmacologie des récepteurs du NPY, exprimés dans divers tissus vasculaires et non-vasculaires, à savoir la veine saphène, l'iléon et le vas deferens de lapin, la veine saphène de chien, le vas deferens et le côlon de rat. Plusieurs composés synthétiques reliés au NPY (agonistes et antagonistes) ont été testés pour caractériser leurs effets biologiques (agoniste partiel, agoniste ou antagoniste) sur ces diverses préparations pharmacologiques. Les résultats ont été comparés à ceux de la littérature afin de valider les réponses de ces préparations pharmacologiques avec celles des cellules transfectées avec des récepteurs clonés et ainsi valider sur les récepteurs natifs la classification des récepteurs du NPY proposée par GÉRALD *et al.* (1996).

Le vas deferens et la veine saphène de lapin ont été décrits comme des systèmes réceptoriels purs de type Y_1 respectivement pré- et post-jonctionnels. Deux autres préparations, le vas deferens de rat et la veine saphène de chien, ont été également caractérisées comme contenant des récepteurs de type Y_2 respectivement pré- et post-jonctionnels. L'iléon de lapin et le côlon de rat ont été utilisées pour caractériser d'autres types de récepteurs du NPY. Plus précisément, le côlon de rat est maintenant considéré comme un système mixte de types Y_2 et Y_4 tandis que l'iléon de lapin serait de type Y_4 , Y_5 et/ou y_6 .

Une analyse comparative simple des valeurs d'affinités apparentes des agonistes utilisés dans notre étude et celles présentées dans la littérature montre que les récepteurs Y_1 et Y_2 qui causent les réponses des quatre préparations mentionnées ci-haut sont d'un de vue pharmacologique très semblables sinon identiques aux récepteurs clonés. De plus, les effets biologiques des agonistes sont bloqués par des antagonistes sélectifs des

récepteurs Y_1 et Y_2 ce qui valide la classification suggérée. La caractérisation des récepteurs Y_2 et Y_4 exprimés dans le côlon de rat a été réalisée grâce à l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes divers. Ces deux récepteurs, bien qu'ils soient exprimés dans le même tissu et bien qu'ils produisent les mêmes effets biologiques (contraction), peuvent être étudiés séparément en utilisant des agonistes sélectifs ou des antagonistes pour bloquer sélectivement l'un ou l'autre des deux récepteurs présents. En fait, le récepteur Y_2 dans le côlon de rat peut être étudié en utilisant le PYY(3-36) et le composé BIIE0246 comme agoniste et antagoniste sélectifs Y_2 tandis, que le type Y_4 peut être étudié en éliminant l'activité biologique du récepteur Y_2 avec le BIIE0246 ou en utilisant le PP comme agoniste sélectif Y_4 . Sur l'iléon de lapin, le récepteur du NPY exprimé semble être atypique. Bien que nous ayons démontré que l'effet biologique du hPP sur l'iléon de lapin soit inhibé par le JCF104 (antagoniste putatif du récepteur Y_5), le même effet s'avère insensible aux nouveaux antagonistes du récepteur Y_5 , beaucoup plus puissants que le JCF104. Cette observation nous incite à remettre en question la suggestion que le récepteur du NPY présent dans l'iléon de lapin est uniquement du type Y_5 . La classification des récepteurs du NPY dans l'iléon de lapin a été discutée plus en détail dans la section "Discussion".

Les effets pharmacologiques de divers antagonistes (les plus importants) des récepteurs du NPY, ont été évalués d'avantage afin de classer les divers antagonistes disponibles. Parmi les différents composés, le BIBP3226 et le BIBO3226 se comportent comme des antagonistes purs, sélectifs et compétitifs. Le GW1229 est non sélectif donc il peut être considéré comme antagoniste ou agoniste puissant. Le composé S-28 est un faible agoniste ou antagoniste non sélectif. Finalement, le S-34 n'est simplement qu'un faible agoniste non-sélectif. Certains agonistes partiels ont été également identifiés à

savoir le NPY et le NPY(2-36) sur l'iléon de lapin. Nous espérons que les préparations pharmacologiques décrites dans cet article de revue serviront à la caractérisation des nouveaux agents qui interagissent avec les récepteurs du NPY et à déterminer ou non leur degré respectif de sélectivité, de spécificité et de compétitivité. Nous espérons également que les données présentées dans cet ouvrage fourniront des outils adéquats pour l'investigation des actions complexes du NPY dans l'intestin et le système nerveux central.

ARTICLE 5

***[Nphe¹]nociceptin-(1-13)NH₂ selectively antagonizes nociceptin effects in the rabbit
isolated ileum***

Pheng, L.H., Calo, G., Guerrini, R. & Regoli, D.

Eur. J. Pharmacol. 397 (2-3); 383-388, 2000.

Sommaire :

Notre deuxième objectif a été celui d'identifier des préparations pharmacologiques sensibles à la nociceptine qui est un neuropeptide exerçant des effets biologiques aussi importants que le NPY, du moins au niveau du cerveau. L'iléon de lapin est une préparation très sensible à la nociceptine (NC). Cette préparation pharmacologique a déjà été décrite pour l'étude du NPY (voir l'article n° 2). De façon similaire au NPY et à ses congénères, la dynorphine A et la NC induisent des fortes relaxations sur l'iléon de lapin et ce, d'une façon dépendante de la concentration. Ces effets sont spécialement inhibés respectivement par la naloxone et le $[Nphe^1]NC(1-13)NH_2$. Le $[Nphe^1]NC(1-13)NH_2$ est un antagoniste compétitif du récepteur OP_4 , lequel relaye les effets relaxants de la NC. Cet antagoniste inhibe également les effets des agonistes partiels du récepteur OP_4 , à savoir la NC, le $[Phe^1\psi(CH_2-NH) Gly^2]NC(1-13)NH_2$ et le RYYWK- NH_2 . Ces résultats indiquent que le site fonctionnel relayant l'effet relaxant ou inhibiteur de la NC sur l'iléon de lapin possède un profil pharmacologique identique à celui des sites OP_4 identifiés chez d'autres espèces animales (souris, rat, cobaye, humain) car la valeur de pA_2 de l'antagoniste $[Nphe^1]NC(1-13)NH_2$ est similaire à celles obtenues dans les autres tissus provenant des autres espèces animales. De plus, l'iléon de lapin est une des préparations qui permet de classer les composés interagissant avec les récepteurs OP_4 comme agonistes purs, agonistes partiels ou antagonistes. L'intérêt principal de cette préparation dérive du caractère agoniste du composé $[Phe^1\psi(CH_2-NH) Gly^2]NC(1-13)NH_2$ qui se comporte comme antagoniste dans le vas deferens de souris, l'iléon de cobaye et d'autres préparations de tissus périphériques et même dans le système nerveux central. Ce dernier aspect est bien

documenté dans la revue publié récemment par CALO et collaborateurs (CALO *et al.*, 2000b).

L'ensemble de nos résultats suggèrent que, dans l'iléon de lapin, la NC inhibe la relâche d'ACh en activant des sites réceptoriels qui sont exprimés dans les plexus myenteriques. Cette inhibition a pour conséquence de réduire les activités contractiles spontanées de l'intestin. De plus, le [Nphe¹]NC(1-13)NH₂ agit comme un antagoniste pur (dépourvu d'activité intrinsèque), sélectif et compétitif du récepteur OP₄. Un tel profil pharmacologique unique ferait du composé [Nphe¹]NC(1-13)NH₂ en un outil essentiel pour investiguer les actions biologiques exercées par la NC *in vitro* et *in vivo*.

DISCUSSION

Le NPY et la NC sont des neuropeptides exprimés abondamment dans les neurones et ils exercent plusieurs effets importants au niveau du système nerveux central et dans des tissus et organes périphériques. Le but principal de notre étude a été de rechercher les récepteurs du NPY et de la NC dans plusieurs tissus périphériques qui reçoivent l'innervation du système nerveux autonome et qui contiennent d'autres fibres nerveuses telles les fibres sensorielles. En deuxième lieu, nous avons voulu établir si les récepteurs de ces peptides sont exprimés exclusivement sur les neurones ou s'ils le sont aussi sur d'autres types de cellules, telles les fibres musculaires lisses, les cellules endothéliales et d'autres cellules (immunitaires) dont les mastocytes qui se trouvent dans les tissus conjonctifs. Enfin, nous avons caractérisé les récepteurs des deux neuropeptides à l'aide d'agonistes (sélectifs?) et surtout avec de nouveaux antagonistes.

La présence des deux neuropeptides, NPY et NC, a été démontrée dans les nerfs périphériques du système nerveux sympathique (SNS), du parasympathique (SNP), du système non-adrénergique et non-cholinergique (NANC) et du système sensoriel particulièrement au niveau des plexus entériques chez plusieurs espèces animales (HAZELWOOD, 1993; HARRISON et GRANDY, 2000; CALO *et al.*, 2000b). La présence de récepteurs pour ces deux neuropeptides a aussi été démontrée sur différentes fibres nerveuses du système nerveux autonome. Il a été rapporté que différents types de récepteurs du NPY et le récepteur OP_4 de la NC sont distribués dans les mêmes régions que leurs ligands. *Il apparaît donc que, dans certains organes (intestin, voies aériennes), les systèmes NPY/ Y_1 , Y_2 , Y_4 et NC/ OP_4 sont présents en entier (ligand et récepteur) et de toute évidence sont fonctionnels.* Nos résultats confirment la présence dans plusieurs

tissus de sites fonctionnels pour le NPY et la NC qui peuvent être considérés comme récepteurs spécifiques pour l'un ou l'autre peptide.

Les ligands et leurs récepteurs sont localisés premièrement dans les structures nerveuses, à partir desquelles ils pourraient moduler la libération d'autres médiateurs de toute nature, la noradrénaline, l'acétylcholine, les neuropeptides sensoriels, possiblement les peptides opioïdes, les acides aminés neurotransmetteurs et autres agents (e.g. des autacoïdes comme les prostaglandines). En outre, certains types de récepteurs du NPY (Y_1 , Y_2) sont aussi localisés dans d'autres types de cellules, tels les muscles lisses où ils stimulent l'accumulation de Ca^{2+} intracellulaire et la contraction. Les résultats décrits dans cette thèse confirment ces faits en démontrant des actions inhibitrices pour le NPY et la NC sur les structures nerveuses périphériques et l'action stimulante du NPY sur certains muscles lisses vasculaires. Les effets du NPY sur les neurones sont plutôt de type inhibiteurs et ils seraient véhiculés par l'inhibition de l'adénylate cyclase et des canaux calciques (COLMERS et PITTMAN, 1989; FOUCART et MAJEWSKI, 1989; MILLAR *et al.*, 1991; HEXUM *et al.*, 1994; LEMOS et TAKEDA, 1995; EWALD *et al.*, 1988). La NC n'exerce que des effets inhibiteurs sur les neurones et ces effets seraient aussi véhiculés par l'inhibition de l'adénylate cyclase et des courants calciques ou par la stimulation des courants potassiques (voir article de revue par HARRISON et GRANDY, 2000). Les deux systèmes peptidiques du NPY et de la NC exercent donc des fonctions modulatrices (inhibitrices) sur plusieurs fibres nerveuses du SNA et leurs récepteurs pourraient être considérés, dans certains cas, comme autorécepteurs. D'autre part, les mêmes récepteurs, si exprimés par d'autres cellules (e.g. fibres musculaires lisses) peuvent médier des effets opposés (de type stimulant), tels la contraction musculaire ou une facilitation de la relâche de différents neurotransmetteurs

Dans notre étude, nous avons exploré à la fois les effets du NPY et de ses congénères sur les muscles lisses, pour mieux définir les effets stimulants de cette famille de peptides et les effets inhibiteurs du NPY et de la NC sur la sécrétion neurohormonale. Nous avons utilisé les données pharmacologiques dérivées des effets du NPY et de la NC pour 1) identifier des préparations pharmacologiques sensibles à la NC et au NPY, 2) élucider les mécanismes d'action des deux peptides et 3) caractériser leurs récepteurs respectifs sur la base de leur expression ou non dans divers types cellulaires. Notre étude a débuté par une recherche systématique d'effets pharmacologiques facilement détectables sur plusieurs organes isolés (intestin, vaisseaux sanguins, vasa deferentia, vessie, vésicule biliaire, etc.) afin d'identifier les tissus qui manifestent une sensibilité à la présence du NPY ou de la NC pour ensuite tenter de localiser les sites d'action des deux neuropeptides. Le seul effet biologique auquel nous sommes attardés a été le changement de tonus induits sur les muscles lisses; dérivant soit d'une activation directe sur le muscle lisse par le NPY (uniquement) (par exemple dans les veines saphènes de chien et de lapin) soit d'une inhibition du relargage d'un neurotransmetteur endogène (modulation, en général une inhibition), par exemple, dans les vas deferens de rat, de souris et de lapin, dans l'iléon de lapin ou le côlon descendant de rat. Les résultats que nous avons présentés dans les diverses publications nous ont permis de préciser les effets du NPY sur le couplage stimulation-contraction et ceux du NPY et de la NC sur le couplage stimulation-sécrétion.

1. Préparations tissulaires

1.1 Préparations vasculaires

En périphérie, le NPY est retrouvé seul ou colocalisé avec la NE dans les fibres du SNS qui entourent plusieurs vaisseaux sanguins (WHARTON et GULBENKIAN, 1989). L'infusion de NPY dans la circulation sanguine produit une augmentation importante de la pression artérielle (LUNDBERG et TATEMOTO, 1982). Cet effet sur la pression artérielle semble être relayé par des mécanismes directs sur le muscle lisse vasculaire, à savoir la vasoconstriction, et la potentialisation du tonus vasculaire soutenu par divers vasoconstricteurs tels la NE, l'histamine, l'angiotensine II, la 5-HT, les prostaglandines et l'endothéline (EDVINSSON *et al.*, 1984). Ces effets ont été démontrés sur divers vaisseaux sanguins (veines, artères) provenant du rat, du lapin et du chien (LUNDBERG *et al.*, 1985a; EDVINSSON *et al.*, 1984, 1989; ABEL et HAM, 1989). Le NPY exerce aussi des effets directs sur les vaisseaux de résistance, entre autres les artères coronariennes de plusieurs espèces animales incluant l'homme (McDERMOTT *et al.*, 1993) et ceci à travers la stimulation de récepteurs localisés vraisemblablement sur les muscles lisses artériels. Notre étude a été limitée au circuit veineux où le NPY y exerce des effets stimulants sur le muscle lisse. Dans le premier article présenté dans cette thèse, nous avons démontré, que la veine saphène de chien est une nouvelle préparation pharmacologique qui répond au NPY par une contraction (PHENG *et al.*, 1997a). L'effet contractile du NPY induit sur la veine saphène de chien ressemble à celui qui a été rapporté auparavant (CADIEUX *et al.*, 1993) et confirmé dans cette thèse sur la veine saphène de lapin (PHENG et REGOLI, 2000). Il s'agit d'effets stimulants générés par des actions directes du peptide sur les muscles lisses

Vraisemblablement, le NPY induit une augmentation de la concentration du Ca^{2+} via une augmentation de production de l' IP_3 (PERNEY et MILLER, 1989). Nos résultats diffèrent des données rapportées en 1996 par HUNTER et collaborateur (HUNTER *et al.*, 1996) qui affirment que le NPY ne produit aucun effet myotrope sur la veine saphène de chien. Nous avons tenté d'expliquer cette divergence en comparant les conditions et protocoles expérimentaux utilisés dans les deux laboratoires. En fait, HUNTER et ses collaborateurs ont utilisé des segments coupés en anneau au lieu de bandelettes coupées en hélice. Il est aussi possible que la portion de veine utilisée par HUNTER et collaborateurs soit différente de celle que nous avons étudiée et qui est insensible au NPY. À cet égard, nous avons observé que seul un court segment de 3-4 cm de la vena geniculata (genou) s'avère être sensible au NPY : la portion restante de cette veine ne répond presque pas à ce peptide.

Le mécanisme sous-jacent à l'effet induit par le NPY sur la veine saphène de chien est plutôt complexe étant donné que l'effet contractile du NPY serait inhibé par des métabolites de l'acide arachidonique. En fait, lorsque le segment de la veine saphène de chien est incubé avec l'indométhacine (1 μM) (l'inhibiteur des cyclooxygénases, COX1 et COX2), l'intensité de la réponse contractile générée par le NPY est fortement augmentée. Ceci indique que des prostanoïdes inhibiteurs du tonus veineux sont libérés par le NPY en même temps que le système de la PLC est activé. Ce mécanisme inhibiteur n'a pas été évalué par HUNTER et al. (1996); ceci peut aussi expliquer pourquoi le NPY était inactif dans leurs essais. La source et la nature des métabolites de l'acide arachidonique demeurent inconnues; le mécanisme intracellulaire responsable de l'inhibition du tonus musculaire par ces métabolites est aussi à préciser. Ces métabolites sont générés probablement par l'activation du métabolisme des phospholipides

membranaires sous l'action des phospholipases à savoir la phospholipase A2 (PLA2). Cette enzyme est probablement localisée sur les muscles lisses vasculaires ou dans d'autres types de cellules, étant donné que le phénomène demeure inchangé lorsque l'endothélium de la veine est enlevé. Des résultats montrant que le récepteur du NPY (probablement via les types Y_1 et Y_2) peut activer la voie de PLA2 (MARTIN et PATTERSON, 1989). Il est donc évident que le NPY puisse activer, dans la même cellule (le muscle lisse, ou dans des cellules différentes qui se trouvent dans la veine saphène de chien), au moins deux systèmes effecteurs (deuxième messager), la PLC/IP3/Ca²⁺, lesquels provoqueraient la contraction et la PLA2 qui induirait la libération de prostanoïdes et réduirait le tonus musculaire.

Sur la veine saphène de chien et de lapin, les effets contractiles du NPY sont vraisemblablement relayés par l'activation de récepteurs localisés sur les membranes des fibres musculaires lisses (CADIEUX *et al.*, 1993; PHENG *et al.*, 1997a). Ces récepteurs semblent être couplés à divers effecteurs tels le système de l'IP3 et les canaux calciques, qui sont activés par différentes protéines G, à savoir la Gq et la Gs. En fait, il a été rapporté que les récepteurs du NPY localisés sur le muscle lisse vasculaire stimulent l'ouverture des canaux calciques et ainsi induisent une augmentation de calcium dans le cytoplasme (MICHEL et RASCHER, 1995). Cependant, il n'a pas encore été précisé quel type de protéine G (couplée aux récepteurs du NPY) produit l'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire. La protéine qui a été le plus souvent impliquée dans la mobilisation du calcium intracellulaire est la Gq; laquelle intervient dans des effets stimulants tels la contraction des muscles lisses ou la relâche d'hormones ou de neurotransmetteurs. Il a déjà été rapporté que la protéine Gi/Go peut aussi stimuler l'augmentation de calcium intracellulaire via la voie de la PKC (LOU *et al.*, 1997). Dans les vaisseaux sanguins, le

NPY semble exercer ses effets vasoconstricteurs via des protéine G sensibles à la toxine pertussique (MORRIS, 1991). Étant donné que la vasoconstriction est une réponse stimulante, la protéine G qui la génère serait plutôt couplée à la voie calcique (extra et intra-cellulaire) qu'à l'inhibition adénylate cyclase.

La caractérisation des récepteurs du NPY sur les deux veines isolées, les veines saphènes de lapin (récepteur Y_1) et de chien (récepteur Y_2), a été réalisée en utilisant des agonistes et des antagonistes. Parmi les agonistes, nous avons testé l'analogue [Leu³¹, Pro³⁴]NPY et les fragments C-terminaux du NPY. Dans les études initiales, les deux types de récepteurs avaient été localisés sur diverses cellules dont le type Y_1 exprimé par les muscles lisses (post-jonctionnel), et les récepteur Y_2 avaient été considérés comme des autorécepteurs localisés sur les neurones sympathiques (pré-jonctionnels) (WAHLESTEDT *et al.*, 1986). La présente étude a confirmé que l'effet vasoconstricteur direct du NPY ou la potentialisation des effets d'autres vasoconstricteurs sont véhiculés par des sites fonctionnels de type Y_1 (McDERMOTT *et al.*, 1993; FUHLENDORFF *et al.*, 1990; GRUNDEMAR *et al.*, 1992; SHEIKH, 1991) localisés au niveau post-jonctionnel (en accord avec CADIEUX *et al.*, 1993). Par contre, les résultats obtenus sur la veine saphène de chien démontrent que le récepteur Y_2 , qui avait été considéré uniquement comme pré-jonctionnel dans les études initiales, est aussi exprimé par les muscles lisses et peut se retrouver au niveau post-jonctionnel (PHENG *et al.*, 1997a). Ceci remet en question l'hypothèse de WAHLESTED *et al.* (1986). La veine saphène de chien est donc une nouvelle préparation qui permet d'étudier la pharmacologie des récepteurs Y_2 du muscle lisse vasculaire.

Depuis le clonage d'autres types de récepteurs pour le NPY, la classification pharmacologique des récepteurs du NPY qui fut basée uniquement sur l'ordre de

puissance des agonistes, est devenue insuffisante, faute d'un manque de sélectivité de la part des agonistes naturels et certains de leurs analogues qui initialement étaient considérés sélectifs (e.g. [Leu³¹, Pro³⁴]NPY et le PYY(3-36)). La découverte récente de certains antagonistes sélectifs pour le Y₁ et le Y₂ a toutefois permis de bien caractériser les récepteurs du NPY, en particulier les types Y₁ et Y₂. La plupart des nouveaux composés, connus comme agonistes ou antagonistes sélectifs des récepteurs Y₁ et Y₂, ont été utilisés dans la présente étude. Nos résultats nous ont permis d'abord de statuer sur les types de récepteurs exprimés par les veines saphènes de lapin et de chien en utilisant différents antagonistes très sélectifs. Les composés non peptidiques tels le BIBP3226, le BIBO3304 et le SR120819A sont classés comme antagonistes puissants (pA₂ 7.3-8.7) du récepteur Y₁ qui ont une bonne sélectivité. Le GW1229, un composé de nature pseudo-peptidique, se comporte comme un antagoniste puissant (pA₂ 9.5) sur la veine saphène de lapin, alors qu'il est inactif sur celle du chien. Cependant, ce composé s'est avéré non sélectif car il agit aussi comme un antagoniste sur l'iléon de lapin et le côlon de rat (voir plus loin). Le BIIE246, un composé non peptidique nouvellement développé par DOODS *et al.* (1999), se comporte comme un antagoniste très sélectif pour le récepteur Y₂. Par contre, le T₄-[NPY₃₃₋₃₆]₄ agit plutôt comme un antagoniste faible (pA₂ ≈6.5) du récepteur Y₂. Certains composés comme le [D-Trp³²]NPY et la benextramine qui étaient considérés comme des antagonistes pour le récepteur Y₁ (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 1994), ne montrent aucune activité sur nos préparations pharmacologiques.

Dans les études visant à identifier des préparations vasculaires utilisables dans la pharmacologie des neuropeptides, nous avons aussi testé la nociceptine. Ce peptide n'a montré aucun effet (contractile ou relaxant) sur un grand nombre de vaisseaux isolés et spécialement sur les veines saphènes de chien et de lapin. Cependant, il a été rapporté

que ce peptide produit des effets hypotenseurs lorsque administré par voie intraveineuse et ceci est probablement dû en grande partie à une inhibition du système nerveux sympathique (GUMUSEL *et al.*, 1997; GIULIANI *et al.*, 1997). Les effets de la NC sur le système cardio-vasculaire seraient donc indirects (voir article de revue par CALO *et al.*, 2000b).

1.2. Vasa deferentia et préparations d'origine intestinale

1.2.1 Vas deferens de rat et de lapin

Les vasa deferentia isolés et stimulés électriquement sont des préparations classiques très utilisées pour étudier les implications de diverses hormones dans le contrôle du système nerveux autonome. La stimulation électrique a pour effet de libérer des neurotransmetteurs qui vont stimuler à leur tour les muscles lisses du canal déférent pour y induire une contraction. Les réponses ainsi générées par la stimulation électrique sont quantifiables à l'aide du système de bain à organes isolés. Il a été démontré que le NPY et la NC inhibent les contractions des vasa deferentia de lapin et de rat stimulés électriquement en réduisant les décharges des fibres sympathiques via des récepteurs pré-jonctionnels. Ces effets inhibiteurs du NPY sont probablement associés à des sites réceptoriels couplés aux protéines Gi/Go qui inhibent l'adénylate cyclase.

Les vasa deferentia de rat et de lapin ont été parmi les premières préparations biologiques utilisées dans la pharmacologie du NPY. À l'origine, le vas deferens de rat fut considéré comme un système récepteuriel de type Y_2 sur la base d'une comparaison des puissances relatives du NPY et de certains de ses fragments en C-terminal (WAHLESTEDT *et al.*, 1986). Le vas deferens de lapin, par contre, fut aussi utilisé pour

la caractérisation des récepteurs de type Y_1 localisé du côté pré-jonctionnel (DOODS et KRAUSS, 1991). Les études antérieures furent réalisées uniquement avec des agonistes, qui notamment ne sont pas sélectifs. Les résultats de notre étude avec des antagonistes ont confirmé que les récepteurs qui se trouvent dans les vas deferens de lapin et de rat sont en effet respectivement de types Y_1 et Y_2 . Ainsi, les profils pharmacologiques de ces deux récepteurs démontés comme étant présents au niveau du vas deferens de lapin et de rat sont les mêmes que ceux déterminés sur des cellules transfectées (GERALD *et al.*, 1996) avec les deux récepteurs Y_1 et Y_2 clonés. De plus, on remarque qu'il y a une bonne correspondance entre les profils pharmacologiques des récepteurs pré-jonctionnels (vas deferens de rat et de lapin) et post-jonctionnels (veines saphènes de lapin et de chien) qui transmettent des effets biologiques bien distincts. Ceci indique que les signaux de transduction couplés à ces récepteurs ne modifient pas l'affinité ni de l'un ou de l'autre des 2 types de récepteurs face à l'action des agonistes ou des antagonistes. Les veines saphènes de lapin et de chien et les vasa deferentia de rat et de lapin permettent donc d'évaluer avec une certaine sécurité l'activité biologique de différents agents capables d'interférer avec les récepteur Y_1 et Y_2 natifs du NPY et naturellement exprimés dans les muscles lisses et les neurones.

Les vasa deferentia de diverses espèces sont aussi des préparations biologiques classiques qui sont largement utilisées pour étudier les récepteurs des peptides opioïdes. Récemment, il a été montré que les vas deferens de rat et de souris sont sensibles à la NC et contiennent les récepteurs OP_4 de la NC au niveau de leurs terminaisons nerveuses (GUERRINI *et al.*, 1998; OKAWA *et al.*, 1999). Par contre, le vas deferens de lapin est insensible à la NC, suggérant que le système NC/ OP_4 soit soutient différentes fonctions dans cet organe ou soit que son taux d'expression varie selon les espèces. Plusieurs

études ont rapporté que la NC inhibe les contractions du canal déférent stimulé électriquement chez la souris et le rat (RIZZI *et al.*, 1999; MENZIES *et al.*, 1999; OKAWA *et al.*, 1999; GUERRINI *et al.*, 1998; BIGONI *et al.*, 1999) en empêchant la libération de neurotransmetteurs provenant des neurones sympathiques. Des effets inhibiteurs semblables ont aussi été observés dans d'autres préparations isolées et stimulées électriquement, entre autres les bronches et le pelvis rénale de cobaye (RIZZI *et al.*, 1999b, BIGONI *et al.*, 1999). Les vasa deferentia, étant déjà connus et amplement utilisés dans les études de la pharmacologie de la NC, n'ont pas été considérés dans la présente étude.

1.2.2 Préparations d'origine intestinale : l'iléon de lapin

Le NPY exerce une multitude d'effets biologiques au niveau du tractus gastro-intestinal. Il a été montré que ce peptide inhibe la sécrétion de certaines enzymes et la motilité intestinale chez le rat (LOUIE *et al.*, 1985; LABURTHE, 1991). Dans l'article numéro 2, nous avons montré que l'iléon de lapin est une nouvelle préparation biologique sensible au NPY et à ses homologues (PHENG *et al.*, 1997b). Il s'agit d'un tissu qui ne requiert aucune stimulation électrique car il présente une activité spontanée régulière et stables, laquelle dérive d'une stimulation spontanée par les neurones excitateurs de type cholinergique. Ceci a été démontré en utilisant de l'atropine (1 μ M) et de la TTX (1 μ M), deux agents qui éliminent complètement l'activité spontanée chez l'iléon de lapin. Les neurones impliqués font probablement partie du circuit des réflexes péristaltiques (WOOD, 1987) qui sont préposés à la propulsion du bol alimentaires dans l'intestin. Chez certaines espèces, les mouvements péristaltiques (activités spontanées) de l'intestin isolé peuvent être amplifiés et/ou générés par des stimulations électriques À titre

d'exemple, les contractions de l'iléon de cobaye sont généralement obtenues avec des impulsions électriques et ceci permet d'utiliser cette préparation biologique pour caractériser les récepteurs pré-synaptiques de plusieurs peptides dont ceux des opioïdes et le récepteur OP_4 (GUERRINI *et al.*, 1998).

Sur l'iléon de lapin, le NPY et ses homologues exercent des effets inhibiteurs en agissant au niveau pré-jonctionnel et en inhibant l'activité des neurones excitateurs cholinergiques. Cette observation est supportée par les données de la littérature où il a clairement été montré que le NPY inhibe les activités musculaires intestinales via une intervention avec les neurones excitateurs (LABURTHE, 1990; SHEIKH, 1991). Donc, les effets du NPY sur l'iléon de lapin sont d'ordre pré-jonctionnels et de nature inhibitrice. Bien que la voie de signalisation intracellulaire couplée au récepteur du NPY dans l'iléon de lapin ne soit pas encore élucidée, on peut spéculer que les récepteurs du NPY sont couplés aux protéines Gi/Go ou à des canaux ioniques tels que car le NPY exerce un effet inhibiteur.

À l'origine, l'iléon de lapin a été considéré comme un tissu riche en récepteurs de type Y_5 (PHENG *et al.*, 1997b). Ce récepteur fut caractérisé uniquement avec des agonistes. Il fut observé que l'iléon de lapin montre une forte sensibilité au polypeptide pancréatique tandis qu'il est insensible aux antagonistes des récepteurs Y_1 et Y_2 indiquant que les récepteurs du NPY dans l'iléon de lapin sont de types différents de ceux retrouvés dans les veines saphènes et les vasa deferentia. L'iléon de lapin a été considéré comme une préparation enrichie en récepteur de type Y_5 à cause de la ressemblance du profil pharmacologique avec celui obtenu chez le récepteur Y_5 cloné de rat et par la faible affinité de l'antagoniste proposé pour le récepteur Y_5 , le JCF104 (PHENG *et al.*, 1997b). Cependant, le NPY, le PYY(3-36) et le NPY(2-36), considérés comme des agonistes

complets pour le récepteur Y_5 , sont très peu actifs sur l'iléon de lapin. De plus, les nouveaux antagonistes du récepteur Y_5 (e.g. CGP71683A et Synaptic 34) se sont avérés inactifs pour bloquer les effets du hPP (FELETOU *et al.*, 1999; PHENG et REGOLI, 2000). Ces données nous incitent à remettre en question l'attribution du récepteur Y_5 comme site fonctionnel de l'effet inhibiteur du NPY sur l'iléon de lapin, une interprétation que nous avons proposée antérieurement (PHENG *et al.*, 1997b). Une analyse plus approfondie des résultats d'affinité et d'activité biologique de nouveaux composés nous porte à croire que le récepteur du NPY chez l'iléon de lapin serait de nature atypique. D'une part, le GW1229, un antagoniste du récepteur Y_1 , agit comme un puissant agoniste sur l'iléon de lapin. D'autre part, le hPP, un agoniste de puissance moyenne sur le récepteur Y_5 montre une affinité apparente plus élevée que celle du rPP sur cette même préparation. Ces deux données pharmacologiques suggèrent que le récepteur du NPY présent sur l'iléon de lapin s'apparente davantage au type Y_4 humain (FELETOU *et al.*, 1999) et diffère de celui retrouvé chez le rat. Il est à noter que le récepteur Y_4 diffère aussi d'une espèce à l'autre quant l'on compare les valeurs d'affinité pour certains agonistes, plus particulièrement pour le PP. On a rapporté que le récepteur Y_4 reconnaît préférentiellement le PP de l'espèce d'où origine les tissus cibles : par exemple, sur le récepteur Y_4 humain, le hPP est dix fois plus puissant que le rPP (GEHLERT *et al.*, 1996a). Mais ceci n'est pas toujours le cas car chez le rat, on a noté que le récepteur Y_4 est capable de lier le PP humain avec une affinité similaire à celui de rat. Au sein de la famille du NPY, le PP est le peptide le moins conservé durant l'évolution : il a donc été postulé que le récepteur Y_4 aurait aussi évolué de façon similaire à son ligand naturel (ERIKSSON *et al.*, 1998)

Pour l'instant, le récepteur du NPY retrouvé au niveau de l'iléon de lapin a été classé comme étant du même que le type Y_4 humain (FELETOU *et al.*, 1999). À ce propos, on a rapporté que l'ARNm du récepteur Y_4 est exprimé presque uniquement dans les intestins chez l'homme (LUNDELL *et al.*, 1995) et très peu dans les autres organes ou tissus périphériques. Ce récepteur semble alors être impliqué dans les fonctions du système digestif. Toutefois, on ne peut écarter l'hypothèse que l'iléon de lapin puisse exprimer plusieurs autres types de récepteurs du NPY, à savoir le Y_4 , Y_5 , y_6 lesquels sont typiques à cette espèce ou tout simplement un autre récepteur de nature encore inconnu. Ceci reste à être clarifié, soit à l'aide d'autres outils pharmacologiques plus sélectifs et spécifiques, soit à l'aide de méthodes d'hybridations *in situ* ou de RT-PCR en utilisant des sondes ou des amorces oligonucléotides spécifiques. Pour l'instant, la présente étude nous a permis de valider le fait que l'iléon de lapin est une nouvelle préparation biologique utilisable *in vitro* pour étudier les nouveaux types de récepteurs natifs du NPY localisés vraisemblablement sur les neurones du plexus myentérique.

L'iléon de lapin est une nouvelle préparation aussi très sensible à la NC. Nous avons montré que la NC induit une inhibition de l'activité spontanée chez l'iléon de lapin via le même mécanisme que celui véhiculant l'effet du NPY (PHENG *et al.*, 2000a); elle inhibe la relâche d'acétylcholine libérée des neurones excitateurs. En fait, l'effet de la NC est bloqué par l'atropine et par le TTX. Sur l'iléon de lapin comme dans la plupart des préparations pharmacologiques identifiées comme sensibles à la NC (CALO *et al.*, 2000b), ce peptide exerce ses effets inhibiteurs via une interaction avec des récepteurs localisés au niveau pré-jonctionnel. Il a été trouvé que dans l'intestin, la NC inhibe aussi le transport actif d'anions au niveau de la muqueuse intestinale et altère les contractions d'autres segments du tube gastro-intestinal tels l'estomac et le petit intestin et ce, chez

plusieurs espèces animales (ZHANG *et al.*, 1997; OSINSKI *et al.*, 1999a,b; YAZDANI *et al.*, 1999). On remarque donc que tous ces effets sont inhibiteurs et produits uniquement via des récepteurs pré-synaptiques, lesquels sont couplés aux protéines Gi/Go ou aux courants ioniques tel que décrit ci-haut (voir HARRISON et GRANDY, 2000).

Toutes les études pharmacologiques pratiquées au niveau central et en périphérie semblent suggérer qu'il existe un seul type de récepteur pour la NC. Nous avons démontré que les effets inhibiteurs de la NC sur l'iléon de lapin sont associés au récepteur OP₄. Cette reconnaissance de l'existence du récepteur OP₄ dans divers essais biologiques repose sur les valeurs d'affinités obtenues avec quelques agonistes et un seul antagoniste. Les deux composés les plus importants sont le [F/G]NC(1-13)NH₂ et le [Nphe1]NC(1-13)NH₂. Le premier composé se comporte comme un antagoniste, un agoniste partiel ou un agoniste complet, selon le type de tissu cible utilisé. Il agit comme un antagoniste ou un agoniste partiel sur la plupart des organes isolés et comme agoniste pur ou antagoniste sur les préparations neuronales (CALO *et al.*, 2000a,b). Dans l'iléon de lapin, le [F/G]NC(1-13)NH₂ se comporte comme un agoniste partiel (PHENG *et al.*, 2000a). Ces données indiquent que l'iléon de lapin est une préparation pharmacologique qui ressemble aux préparations neuronales ou cérébrales au point de vue de sa sensibilité au composé [F/G]NC(1-13)NH₂. Par contre, *in vivo*, ce composé agit comme agoniste complet au niveau des fonctions nerveuses centrales. Pour l'instant, nous n'avons aucune explication plausible pour ces différences. Il a déjà été postulé l'existence d'autres sous-types de récepteurs OP₄ (BUTOUR *et al.*, 1998; CALO *et al.*, 1998b; XU *et al.*, 1998), mais cette hypothèse a été écartée car certaines études réalisées avec des animaux dépourvus du gène du récepteur OP₄ semblent démontrer qu'il n'existe qu'un seul type d'OP₄ (CLARKE *et al.*, 1999). Cependant, d'autres évidences, tels l'existence

d'isoformes de l'OP₄ (PAU *et al.*, 1998; PELUSO *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1994; WICK *et al.*, 1994, 1995) et la possibilité de couplage de l'OP₄ à différent mécanisme de transduction, pourraient expliquer les différents profils pharmacologiques du récepteur OP₄ obtenus de différents essais biologiques. Par contre, le [Nphe¹]NC(1-13)NH₂ (antagoniste actif *in vivo*) agit comme un antagoniste compétitif et sélectif sur la plupart des préparations pharmacologiques, comprenant l'iléon de lapin; Ceci suggère que le récepteur OP₄ dans l'iléon de lapin serait du même type que celui qui est exprimé dans d'autres tissus provenant de diverses espèces animales. Donc, l'iléon de lapin est une nouvelle préparation pharmacologique qui permet de caractériser de nouveaux agents conçus pour interférer avec le récepteur OP₄ et agissent au niveau du système gastrointestinal.

1.2.3 Côlon descendant de rat

Il a été démontré que le NPY exerce plusieurs effets importants au niveau du système digestif dont l'inhibition de la sécrétion gastrique et de la motilité intestinale (SHEIKH, 1991; PLAYFORD and COX, 1996). Cependant, le côlon descendant de rat est une préparation biologique qui répond au NPY et à ses homologues par une forte contraction. Les effets contractiles du NPY et du PYY (mais non celui du PP) sont réduits faiblement par l'atropine. Nous avons démontré également que la TTX *per se* produit une forte contraction du côlon et abolissait les effets du PYY ou du PP sans affecter celui de la carbamylcholine. Ceci suggère que le NPY et ses homologues agissent au niveau pré-jonctionnel pour produire des effets contractiles qui dépendent en partie des voies cholinergiques (PHENG *et al.*, 1999). Il est possible que d'autres agents stimulateurs de la contraction des muscles lisses intestinaux, tels les neurokinines, soient

relâchés par le NPY. À cet effet, nous avons observé, à l'aide de nos données préliminaires, que les antagonistes des récepteurs des neurokinines, lorsqu'ils sont appliqués à fortes concentrations réduisaient les réponses du côlon au NPY et au hPP, mais cette inhibition semblait être non sélective. En considérant l'effet sélectif de la TTX sur le système nerveux, la contraction évoquée par cette toxine et le bloque exercé par cette toxine envers les effets contractiles du NPY et de ses homologues, nous croyons que l'action stimulante du NPY se fait par l'intermédiaire de neurones inhibiteurs qui seraient bloqués par le NPY. En supprimant les activités des neurones inhibiteurs, le NPY peut induire des effets contractiles sur le côlon de rat. Les neurones inhibiteurs en cause et leurs médiateurs ne sont pas encore connus. Ces neurones sont de type NANC car nous avons aussi démontré que les antagonistes adrénergiques et cholinergiques n'ont aucun effet sur les réponses évoquées par le NPY et ses homologues (PHENG et REGOLI, 1998). Il a été démontré la présence dans l'intestin d'autres neurones inhibiteurs de type NANC qui libèrent des médiateurs relaxants tels le VIP et le NO (WOOD, 1987). Certains résultats non publiés (PHENG *et al.*), obtenus avec le L-NOARG (N^N-Nitro-L-Arginine) (inhibiteur de la NO synthétase) ont révélé que le NPY n'agit pas via la voie de la NO. Alors, le NPY inhiberait probablement la relâche d'autres médiateurs (ex : le VIP), mais ceci n'a pas été investigué ni confirmé.

Le côlon descendant de rat a été utilisé antérieurement comme préparation sensible au NPY et le profil pharmacologique obtenu avec des agonistes a conduit à l'hypothèse de l'existence d'un nouveau type de récepteur désigné Y₁. Cette hypothèse était basée sur l'observation que le côlon de rat était plus sensible au NPY qu'au PYY. Nous avons repris l'analyse du profil pharmacologique de ce récepteur à l'aide de nouveaux agonistes et nous avons trouvé que le côlon de rat est aussi sensible entre autre

au PP suggérant que cette préparation contient soit plus d'un type de récepteurs ou soit qu'elle est enrichie en récepteurs de type Y_3 , car ce dernier récepteur reconnaît assez bien les trois agonistes i.e. NPY, PYY et PP (GERALD *et al.*, 1996). Cependant, aucune trace d'ARNm codant pour le récepteur Y_3 a été retrouvée dans les tissus périphériques incluant le côlon (GERALD *et al.*, 1996; HU *et al.*, 1996). Avec l'aide d'antagonistes, nous avons démontré que la réponse du côlon au NPY est occasionnée par deux types de récepteurs tandis que la réponse au PP est associée à un seul récepteur. Le premier type de récepteur serait de type Y_2 , lequel est sensible au NPY, PYY et aux agonistes sélectifs du récepteur Y_2 , tels les fragments C-terminaux du NPY et le C2-NPY. De plus, les effets contractiles de ces agonistes sont inhibés par le BIIE0246, un nouvel antagoniste qui bloque sélectivement le récepteur Y_2 (DOODS *et al.*, 1999; PHENG et REGOLI, 2000; DUMONT *et al.*, 2000).

Le deuxième site fonctionnel serait activé préférentiellement par le hPP, le rPP et le [Leu³¹, Pro³⁴]NPY et les effets de ces peptides sont insensibles aux antagonistes des récepteurs Y_1 , Y_2 et Y_3 . De plus, le composé JCF104 est inactif comme antagoniste tandis qu'il montre une certaine activité antagoniste sur l'iléon de lapin (PHENG *et al.*, 1997b). En soi, ce composé produit des effets agonistes résiduels et il ne semble pas affecter les contractions induites par le hPP (PHENG *et al.*, 1999), suggérant que le deuxième type de récepteur du NPY sur le côlon de rat serait différent de celui retrouvé sur l'iléon de lapin. Le composé JCF104 a été trouvé actif *in vivo* comme inhibiteur de la stimulation de la prise de nourriture induite par le NPY (GERALD, 1996), mais il s'est avéré inactif *in vitro* (DUMONT *et al.*, 2000) sur les récepteurs Y_4 et Y_5 clonés. Ceci suggère que les effets anti-NPY du JCF104 au niveau central soient relayés soit par une

action non spécifique du composé ou encore via l'inhibition d'un type de récepteur du NPY encore inconnu.

L'ensemble de nos résultats suggère que la réponse contractile du côlon de rat au NPY et à ses homologues soit générée par l'activation de deux types de récepteurs, le Y_2 et le Y_4 , lesquels seraient tous deux localisés au niveau pré-jonctionnel. Les résultats dérivés de d'autres laboratoires appuient nos observations pharmacologiques en démontrant la présence dominante de l'ARNm des récepteurs Y_2 et Y_4 dans le côlon de rat (FELETOU *et al.*, 1998). Donc, la présence de deux sites réceptoriels produisant le même effet pourrait expliquer le profil pharmacologique atypique observé antérieurement, et qui mena à suggérer que le côlon descendant de rat s'était révélé être un essai biologique potentiel pour étudier le récepteur Y_3 (CADIEUX *et al.*, 1990; DUMONT *et al.*, 1993; JACQUES *et al.*, 1995).

Les résultats d'études immunohistochimiques ont révélé que la NC est distribuée dans le système gastro-intestinal du rat (YAZDANI *et al.*, 1999). On la retrouve en plus grande concentration dans les plexus myentériques et la sous la muqueuse. Les résultats des études fonctionnelles *in vitro* ont aussi montré que la nociceptine induit une forte contraction du côlon via l'activation de récepteurs localisés au niveau pré-jonctionnel (YAZDANI *et al.*, 1999; OSINSKI *et al.*, 1999a,b). Nos résultats obtenus sur le côlon de rat avec divers agents pharmacologiques comprenant le TTX et l'atropine suggèrent que les contractions du côlon descendant de rat induites par la NC sont générées via le même mécanisme d'action que celui du NPY (vois ci-dessus). Ces résultats ne sont pas présentés dans cette thèse, mais seront publiés prochainement (PHENG *et al.*, 2000b). Comme le NPY, la NC semble supprimer l'activité des neurones inhibiteurs en inhibant la production d'AMPc et le courant calcique ou en activant le courant potassique et enfin en

diminuant la relâche de neurotransmetteurs encore inconnus. Dans le côlon de souris, il a été montré que la NC induit des contractions en inhibant la voie de la NO (MENZIES et CORBETT, 2000). Ceci n'est pas le cas pour le côlon de rat car il a été rapporté que les effets contractiles de la NC ne sont pas reliés aux voies cholinergique, opioïde, adrénergique, VIPergique, sérotonergique, neurokininergique (SP ?) ou aux prostaglandines (YAZDANI *et al.*, 1999). Les voies de la NO et de l'ATP ne seraient pas impliquées; Ce qui indique que, selon les espèces (rat/souris), la NC exercerait ses effets contractiles via des mécanismes d'action différents. Donc, la NC, comme le NPY, pourrait agir sur des récepteurs pré- jonctionnels pour inhiber ou activer la libération d'autres médiateurs que ceux mentionnés plus haut, entre autre ceux dérivés de l'innervation NANC.

Les effets contractiles de la NC sur le côlon descendant de rat sont dus à l'activation du récepteur OP_4 , lequel a été caractérisé à l'aide d'agonistes et d'antagonistes. L'ordre de puissance des agonistes est $NC(1-13)NH_2 \approx NC > [F/G]NC(1-13)NH_2 \approx Ac-RYYRWK-NH_2$, un profil pharmacologique qui ressemble à celui qui a été obtenu sur le côlon de souris, $NC = NC(1-13)NH_2 = Ac-RYYRWK-NH_2 \approx [F/G]NC(1-13)NH_2$, et avec les cellules CHO_{hOP_4} , $NC \approx NC(1-13)NH_2 \approx [F/G]NC(1-13)NH_2 \approx Ac-RYYRWK-NH_2$ (RIZZI *et al.*, 1999a; HASHIMOTO *et al.*, 2000). En ce qui concerne le composé $[F/G]NC(1-13)NH_2$, le côlon descendant de rat ressemble au côlon de souris (CALO *et al.*, 2000a) puisque le $[F/G]NC(1-13)NH_2$ est un agoniste complet, tandis que sur les autres préparations *in vitro*, il est plutôt agoniste partiel ou antagoniste (voir CALO *et al.*, 2000b). *In vivo*, dans le SNC, le $[F/G]NC(1-13)NH_2$ agit notamment

comme agoniste complet. Le récepteur OP_4 sur le côlon de rat aurait donc un profil pharmacologique semblable à celui que l'on retrouve dans le cerveau.

Par contre, l'antagoniste du récepteur OP_4 , le $[Nphe1]NC(1-13)NH_2$, qui notamment agit comme antagoniste sélectif du récepteur OP_4 dans tous les essais biologiques *in vitro* et *in vivo* qui ont été pratiqués (CALO *et al.*, 2000b), se comporte comme un agoniste assez fort dans le côlon de rat. Ce résultat inattendu nous porte à croire que le récepteur OP_4 sur côlon descendant de rat est différent de celui connu jusqu'à présent et qui se trouve dans une variété de tissu de différentes espèces (voir CALO *et al.*, 2000b). Cette démonstration très originale ouvre des possibilités et des perspectives extrêmement intéressantes pour la préparation que nous avons étudiés. Les résultats de nos expériences ont été soumis pour publication (PHENG *et al.*, 2000b).

CONCLUSION

Le NPY et la NC sont deux neuropeptides principalement exprimés par des neurones pour agir dans le cerveau et en périphérie. Les cinq différents récepteurs (Y_1 , Y_2 , Y_4 , Y_5 et y_6) du NPY et le récepteur de la NC, l'OP₄, sont exprimés dans les neurones cérébraux et dans d'autres cellules ou tissus périphériques. Nous avons exploré les récepteurs périphériques qui se retrouvent sur les terminaisons nerveuses du système nerveux autonome et sur quelques muscles lisses vasculaires, surtout veineux. Le but principal de notre étude a été celui de mettre au point des essais pharmacologiques, de préférence monoréceptoriels, et de caractériser pharmacologiquement les divers récepteurs à l'aide d'agonistes et d'antagonistes. Nous avons étudié les récepteurs natifs du NPY et de la NC, afin de les comparer avec les sites de liaison et les sites fonctionnels du cerveau ou des systèmes exprimant les récepteurs clonés et transfectés. Les résultats présentés dans les cinq articles contenus dans cette thèse nous ont permis d'analyser le récepteur Y_1 qui est exprimé par le muscle lisse veineux de la veine saphène de lapin et de le comparer avec le récepteur Y_1 présent sur les terminaisons nerveuses sympathiques du vas deferens de lapin; les deux sites fonctionnels sont pratiquement identiques. La même conclusion s'applique au récepteurs Y_2 de la veine saphène de chien et de deux tissus du rat, le vas deferens et le côlon. Cette comparaison est basée sur la similarité (voir identité) des valeurs de pA_2 obtenues avec un nouvel antagoniste sélectif, spécifique et puissant pour le récepteur Y_2 . Le paradoxe du récepteur Y_3 qui demeurerait non clarifié a été résolu par la démonstration que la contraction du côlon de rat en réponse au NPY dépend des effets combinés de deux sites fonctionnels, le Y_2 (bien caractérisé) et présumément le Y_4 . Nous avons rencontré des difficultés avec le récepteur Y_5 (qui

semble être essentiel dans la régulation de l'appétit) à cause de la complexité d'une préparation intestinale, l'iléon de lapin, dont la relaxation en réponse au NPY résulterait d'une intervention des récepteurs Y_4 et Y_5 et possiblement du y_6 . Par contre, l'iléon de lapin s'est avéré une préparation très valable pour la NC où elle agit via un récepteur OP_4 . L' OP_4 de l'iléon est localisé sur les terminaisons nerveuses du système nerveux autonome et présente un profil pharmacologique très semblable à celui du récepteur cérébral humain cloné et aux sites fonctionnels impliqués dans diverses fonctions cérébrales de la NC (e.g. locomotion, hyperalgésie).

Il nous est permis d'affirmer que nous avons atteint plusieurs des objectifs que nous nous étions proposés, autant sur la pharmacologie des récepteurs du NPY et de la NC.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr. Domenico Regoli pour m'avoir accepté dans son laboratoire, pour son encadrement et son aide dans la rédaction de cette thèse ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de la réalisation de ce projet.

Je remercie également mes collègues de laboratoire, Dr. Fernand Gobeil Jr., Dr. Witold Neugebauer, Suzanne Nsa Allogho, Stephan Perron, Catherine Felteau, Martin Boussougou et Pierrette Perreault pour leur collaboration, leur encouragement et leur soutien amical.

J'aimerais remercier Hélène Morin et Pascale Martel pour les services administratifs et de secrétariat rendus ainsi que pour leur amitié.

Finalement, je remercie la Fondation des Maladies du Cœur du Canada pour m'avoir accordé un support financier me permettant de réaliser ce projet.

BIBLIOGRAPHIE

- ABEL, P.W. et HAM, C. (1989). Effect of neuropeptide Y on contraction relaxation and membrane potential of rabbit cerebral arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**: 52-63
- ALLEN, J., NOVOTNY, J., MARTIN, J. et HEINRICH, G. (1987). Molecular structure mammalian neuropeptide Y: Analysis by molecular cloning and computer-aided comparison with crystal structure of avian homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:2532-2536.
- ANDREWS, P.C., HAWKE, D., SHIVELY, J.E. et DIXON, J.E. (1985). A non-amidated peptide homologous to porcine peptide YY and neuropeptide Y. *Endocrinology.* **116**: 2677-2681.
- BALASUBRAMANIAM, A., SHERIFF, S., JOHNSON, M.E., PRABHAKARAN, M., HUANG, Y., FISCHER, J.E. et CHANCE, W.T. (1994). [D-TRP32]neuropeptide Y: a competitive antagonist of NPY in rat hypothalamus. *J Med Chem.* **37**:811-5.
- BARABAN, S.C., HOLLOPETER, G., ERICKSON, J.C., SCHWARTZKROIN, P.A. et PALMITER, R.D. (1997). Knock-out mice reveal a critical antiepileptic role for neuropeptide Y. *J Neurosci.* **17**:8927-36.
- BERTORELLI, R., CITTERIO, F., TUPPER, J. et ONGINI, E. (1999). Further analysis of nociceptin and derivatives following intrathecal administration in mice. *Regul. Peptides* **80**: 122.

- BIGONI, R., GIULIANI, S., CALO, G., RIZZI, A., GUERRINI, R., SALVADORI, S., REGOLI, D. et MAGGI, C.A., 1999. Characterization of nociceptin receptors in the periphery: in vitro and in vivo studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **359**: 160-167.
- BISCHOFF, A., AVRAMIDIS, P., ERDBRUGGER, W., MUNTER, K et MICHEL, M.C. (1997). Receptor subtypes Y₁ and Y5 are involved in the renal effects of neuropeptide Y. *Br. J. Pharmacol.* **120**:1335-1343.
- BLOMQVIST, A.G. et HERZOG, H. (1997). NPY-receptor subtypes-how many more? *Trends Neurosci.*, **20**: 294-298.
- BROMME, M., HOKFELT, T. et TEREINIUS, L. (1985). Peptide YY (PYY)-immunoreactive neurons in the lower brainstem and spinal cord of the rat. *Acta Physiol. Scand.* **125** : 340-352.
- BUNZOW, J.R., SAEZ, C., MORTTRUD, M., BOUVIER, C., WILLIAMS, J.T., LOW, M. et GRANDY, D.K. (1994). Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett.* **347**: 284-288.
- BUTOUR, J.L., MOISAND, C., MOLLEREAU, C. et MEUNIER, J.C. (1998). [Phe¹psi(CH₂-NH)Gly²]nociceptin-(1-13)-NH₂ is an agonist of the nociceptin (ORL1) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **349**: R5-R6.

- CADIEUX, A., PHENG, L.H, ST-PIERRE, S., FOURNIER, A. et TAOUDI BENCHEKROUN, M. (1993). The rabbit saphenous vein: a tissue preparation specifically enriched NPY-Y₁ receptor subtype. *Regul. Pept.* 19; 313-324.
- CADIEUX, A., T-BENCHEKROUN, M., FOURNIER, A. et ST-PIERRE S. (1990). Pharmacological actions of neuropeptide Y and peptide YY in rat colon. *Am. N.Y. Acad. Sci.* 611: 372-375.
- CALO, G., GUERRINI, R., BIGONI, R., RIZZI, A., MARZOLA, G., OKAWA, H., BIANCHI, C., LAMBERT, D. G., SALVADORI, S. et REGOLI, D. (2000a) Characterization of [Nphe¹]NC(1-13)NH₂, a new selective nociceptin receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 129: 1183-1193.
- CALO, G., GUERRINI, R., RIZZI, A., SALVADORI, S. et REGOLI, D. (2000b). Pharmacology of nociceptin and its receptor - A novel therapeutic target. *Br J Pharmacol* 129: 1261-1283.
- CALO, G., GUERRINI, R., BIGONI, R., RIZZI, A., BIANCHI, C., REGOLI, D. et SALVADORI, S. (1998a). Structure-activity study of the nociceptin(1-13)-NH₂ N-terminal tetrapeptide and discovery of a nociceptin receptor antagonist. *J. Med. Chem.* 41: 3360-3366.
- CALO, G., RIZZI, A., MARZOLA, G., GUERRINI, R., SALVADORI, S., BEANI, L., REGOLI, D. et BIANCHI, C. (1998b). Pharmacological characterization of the nociceptin receptor mediating hyperalgesia in the mouse tail withdrawal assay. *Br. J. Pharmacol.* 125: 373-378.

- CALO, G., RIZZI, A., BOGONI, G., NEUGEBAUER, V., SALVADORI, S., GUERRINI, R., BIANCHI, C. et REGOLI, D. (1996). The mouse vas deferens: a pharmacological preparation sensitive to nociceptin. *Eur. J. Pharmacol.* **311**: R3-R5.
- CANDELETTI, S., GUERRINI, R., CALO, G. et FERRI, S. (1998). Effects of the nociceptin receptor antagonist $\text{Phe}^1\text{psi}(\text{CH}_2\text{NH})\text{-Gly}^2\text{NC}(1-13)\text{NH}_2$ on nociception in rats. In 29th International Narcotic Research Conference. pp. A170. Garmisch-Partenkirchen, Germany, 20 ± 25 July, 1998. orphanin FQ. *Neurochem. Res.* **21** : 1387-1396.
- CANDELETTI, S. et FERRI, S. (1998). Bidirectional effect of nociceptin on food intake. *Int. Narcotics Res. Conf. Ab.* 1998; A169. Abstract.
- CARTER, D.A., VALLEJO, M., et LIGHMAN, S.I. (1985). Cardiovascular effects of neuropeptide Y in the nucleus tractus solitarius of rats: relationship with noradrenaline and vasopressin. *Peptides* **6**: 421-425.
- CHEN, Y., FAN, Y., LIU, J., MESTEK, A., TIAN, M., KOZAK, C.A. et YU, L. (1994). Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FEBS Lett.* **347**: 279-283.
- CHEN, Y., MESTEK, A., LIU, J., HURLEY, J.A. et YU, L. (1993). Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* **44** : 8-12.

- CHRONWALL, B.M., DiMAGGIO, D.A., MASSARI, V.J., PICKEL, V.M., RUGGIERO, D.A. et O'DONOHUE, T.L. (1985). The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience* **15**: 1159-1181.
- CLARKE, S., CHEN, Z., HSU, M.S., PINTAR, J.E., HILL, R.G. et KITCHEN, I. (1999). Quantitative autoradiography of ORL1, mu, delta, and kappa opioid receptors in the brains of ORL1 or nociceptin (OFQ) knockout mice. In International Narcotics Research Conference. pp. Sun 74. Saratoga Springs, NY, July. 10-15, 1999.
- COLMERS, W.F. et BLEAKMAN, D. (1994). Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons. *Trends Neurosci.* **17**: 373-379.
- COLMERS, W.F. (1990). Modulation of synaptic transmission in hippocampus by neuropeptide Y: presynaptic actions. *Ann. NY Acad. Sci.* **611**: 206-218.
- COLMERS, W.F. et PITTMAN, Q.J. (1989). Presynaptic inhibition by neuropeptide Y and baclofen in hippocampus : Insensitivity to pertussis toxin treatment. *Brain Res.* **498**: 99-104.
- CORDERS, R., LOWRY, P.J. et WITHRINGTON, P.G. (1987). The actions of the peptides, neuropeptide Y and peptide YY, on the vascular and capsular smooth muscle of the isolated blood perfused spleen of the dog. *Br. J. Pharmacol.* **90** : 785-790.
- CORR, L.A., ABERDEEN, J.A., MILNER, P., LINCOLN, J. et BURNSTOCK, G. (1990). Sympathetic and nonsympathetic neuropeptide Y-containing nerves in the rat myocardium and coronary arteries. *Circ. Res.* **66**: 1602-1609.

- DARLAND, T. et GRANDY, D.K. (1998). The orphanin FQ system: an emerging target for the management of pain? *British J Anaesthesia* **81** : 29 –37.
- DARLAND, T., HEINRICHER, M.M. et GRANDY, D.K. (1998). Orphanin FQ/nociceptin. a role in pain and analgesia, but so much more. *Trends Neurosci* **21(5)**:215–21.
- DeQUIDT, M.E. et EMSON, P.C. (1986a). Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system, I. Radioimmunoassay and chromatographic characterization. *Neuroscience* **18**: 527-543.
- DeQUIDT, M.E. et EMSON, P.C. (1986b). Distribution of the neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system, II. Immunohistochemical analysis. *Neuroscience* **18**: 544-618.
- DHAWAN, B.N., CESSSELIN, F., RAGHUBIR, R., REISINE, T., BRADLEY, P.B., PORTOGHESE, P.S. et HAMON, M. (1996). International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors, *Pharmacol. Rev.* **48**: 567-592.
- Di MAGGIO, D.A., CHRONWALL, B.M., BUCHMAN, K. et O'DONOHUE, T.L. (1985). Pancreatic polypeptide immunoreactivity in the rat brain is actually neuropeptide Y. *Neuroscience* **15**: 1149-1157.
- DOODS, H.N., GAIDA, W., WIELAND, H.A., DOLLINGER, H., SCHNORRRENBURG, G., ESSER, F., ENGEL, W., EBERLEIN, W. et

- RUDOLF, K. (1999). BIIE246: A selective and high affinity neuropeptide Y Y₂ receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **384** : R3-R5.
- DOODS, H.N. et KRAUSE, J. (1991). Different neuropeptide Y receptor subtypes in rat and rabbit vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* **204**: 101-103.
- DUMONT, Y., JACQUES, D., ST-PIERRE, J.-A., TONG, Y., PARKER, R., HERZOG, H. et QUIRION, R. (2000a). Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide receptor proteins and mRNAs in mammalian brains. *Petide Receptor. Part I. Handbook of Chem. Neuroanatomy.* **16 (9)**: 375-475.
- DUMONT, Y., CADIEUX, A., DOODS, H., PHENG, L.H., ABOUNADER, R., HAMEL, E., JACQUES, D., REGOLI, D. et QUIRION R. (2000b). BIIE246, a potent and highly selective non-peptide neuropeptide Y Y₂ receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* **129**:1075-88.
- DUMONT, Y., CADIEUX, A., PHENG, L.H., FOURNIER, A., ST-PIERRE, S. et QUIRION, R. (1994). Peptide YY derivatives as selective neuropeptide Y/peptide YY Y₁ and Y₂ agonists devoided of activity for the Y₃ receptor sub-type. *Mol. Brain. Res.* **26**: 320-324.
- DUMONT, Y., SATCH, H., CADIEUX, A., T-BENCHEKROUN, M., PHENG, L.H., ST-PIERRE, S., FOURNIER, A. et QUIRION, R. (1993). Evaluation of truncated neuropeptide Y analogues with modifications of the tyrosine residue in position 1 on Y₁, Y₂ and Y₃ receptor sub-types, *Eur. J. Pharmacol.* **238**: 37-45.

- DUMONT, M., MARTEL, J.C., FOURNIER, A., ST-PIERRE, S. et QUIRION, R. (1992). Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. *Prog. Neurobiol.* **38**: 125-167.
- EBERLEIN, G.A., EYSSELEIN, V.E., SCHAEFFER, M., LAYER, P., GRANDT, D., GOEBELL, H., NIEBEL, W., LEE, T.D., SHIVEL, J.E. et REEVE, J.R.J. (1989). A new molecular form of PYY: Structural characterization of human PYY(3-36) and PYY(1-36). *Peptides* **10**: 797-803.
- EDVINSSON, L., GALBENKIEM, S., WHARTON, J., JANSEN, J. et POLAK J.M. (1989). Peptide-containing nerves in the rat femoral artery and vein: an immunocytochemical and vasomotor study. *Blood Vessels.* **26**: 254-271.
- EDVINSSON, L., EKBALD, E., HAKANSON, R. et WAHLESTEDT, C.(1984). Neuropeptide Y potentiates the effects of various vasoconstrictor agents on rabbit blood vessel. *Br. J. Pharmacol.* **83** : 519-525.
- EKMAN, R., WAHLESTEDT, C. BÖTTCHER, G. HAKANSON, R. et PANULA, P. (1986). Peptide YY-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *Regul. Pept.* **16** : 157-168.
- ERB, K., LIEBEL, J.T., TEGEDER, I., ZEILHOFER, H.U., BRUNE, K. et GEISSLINGER, G. (1997). Spinally delivered nociceptin/orphanin FQ reduces itching behavior in the rat formalin test. *Neuroreport* **8**: 1967-1970.
- ERIKSSON, H., BERGLUND, M.M., HOLMBERG, S.K.S., KAHL, U., GEHLERT, D.R. et LARHAMMAR, D. (1998). The cloned guinea pig pancreatic polypeptide

receptor Y4 resembles more the human Y4 than does the rat Y4. *Regul. Pept.* **75-76**: 29-37.

EVANS, C.J., KEITH, D.E., JR., MORRISON, H., MAGENDZO, K. et EDWARDS, R.H. (1992). Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* **258**: 1952-1955.

EWALD, D.A., STERNWEIS, P.C. et MILLER, R.J. (1988). Guanine nucleotide-binding protein G_o -induced coupling of neuropeptide Y receptors to Ca^{2+} channels in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3633-3637.

FELETOU, M., NICOLAS, J.P., RODRIGUEZ, M., BEAUVERGER, P., GALIZZI, J.P., BOUTIN, J.A. et DUHAULT, J. (1999). NPY receptor subtype in the rabbit isolated ileum. *Br J Pharmacol.* **127**: 795-801.

FELETOU, M., RODRIGUEZ, M., BEAUVERGER, P., GERMAIN, M., IMBERT, J., DROMAINT, S., MACIA, C., BOURRIENNE, A., HENLIN, J.M., NICOLAS, J.P., BOUTIN, J.A., GALIZZI, J.P., FAUCHERE, J.L., CANET, E. et DUHAULT, J. (1998). NPY receptor subtypes involved in the contraction of the proximal colon of the rat. *Regul Pept.* **75-76**: 221-229.

FISCHER, A., FORSSMANN, W.G. et UNDEM, B.J. (1998). Nociceptin-induced inhibition of tachykinergic neurotransmission in guinea pig bronchus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **285**: 902-907.

FLOOD, J.F., HERNANDEZ, E.N. et MORLEY, J.E. (1987). Modulation of memory processing by neuropeptide Y. *Brain Res.* **421**: 280-290.

- FLORIN, S., SUAUDEAU, C., MEURNIER, J.C. et COSTENTIN, J. (1997). Orphanin neuropeptide NocII, a putative pronociceptin maturation product, stimulates locomotion in mice. *Neuroreport*, **8** : 705-707.
- FORSGREN, S. (1989a). Vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in the bovine heart: high degree of coexistence with neuropeptide Y-like immunoreactivity. *Cell Tissue Res.* **256**: 125-135.
- FORSGREN, S. (1989b). Neuropeptide Y-like immunoreactivity in relation to the distribution of sympathetic nerve fibers in the heart conduction system. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **21**: 279-290.
- FOUCART, S. et MAJEWSKI, H. (1989). Inhibition of noradrenaline release by neuropeptide Y in mouse atria does not involve inhibition of adenylate cyclase or a pertussis toxin-susceptible G protein. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **340**: 658-665.
- FUHLENDORFF, J., GETHER, U., AAKERLUND, L., LANGELAND-JOHANSEN, N. et THORGERSEN, H. (1990). [leu³¹, Pro³⁴] neuropeptide Y-a specific Y1 receptor agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **187**: 182-186.
- FUKUDA, K., KATO, S., MORI, K., NISHIMURA, M., TAKESHIMA, H., IWABE, N., MIYATA, T., HOUTANI, T. et SUGIMOTO, T. (1994). cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett.* **343**: 42-46.

FURNESS, J.B., COSTA, M., SUNDLER, F., TAYLOR, I.L. et CHANCE, R.E. (1983).

Distribution, pathways and reactions to drug treatment of nerves with neuropeptide Y- and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in the guinea pig digestive tract. *Cell Tissue Res.* **234**: 71-92.

GEHLERT, D.R. (1998). Multiple receptors for the pancreatic polypeptide (PP-fold) family: physiological implications. *Proc. Exp. Biol. Med.* **218**: 7-22.

GEHLERT, D.R., SCHOBER, D.A., BEAVERS, L., GADSKI, R., HOFFMAN, J.A., SMILEY, D.L., CHANCE, R.E., LUNDELL, I. et LARHAMMAR D. (1996a) Characterization of the peptide binding requirements for the cloned human pancreatic polypeptide-preferring receptor. *Mol. Pharmacol.* **50**:112-8.

GEHLERT, D.R., BEAVERS, L.S., JOHNSON, D., GACKENHEIMER, S.L., SCHOBER, D.A. et GADSKI, R.A. (1996b). Expression cloning of a human brain neuropeptide Y Y2 receptor. *Mol. Pharmacol.* **49**: 224-228.

GEHLERT, D.R. (1994). Subtypes of receptor for neuropeptide Y: implication for the targeting of therapeutics. *Life Sci.* **55**: 551-562.

GERALD, C., WALKER, M.W., BRANCHEK, T. et WEINSHANK, R. (1996). DNA encoding a hypothalamic atypical neuropeptide Y/peptide YY receptor (Y5) and uses thereof. (Synaptic Pharmaceutical Corp) International Publication: WO 96/16542.

GERALD, C., WALKER, M.W., CRISCIONE, L., GUSTAFSON, E.L., BATZL-HARTMANN, C., SMITH, K.E., VAYSSE, P., DURKIN, M.M., LAZ, T.M.,

- LINEMEYER, D.L., SCHAFFHAUSER, A.O., WHITEBREAD, S., HOFBAUER, K.G., TABER, R.I., BRANCHEK, T.A. et WEINSHANK R.L. (1996). A receptor subtype involved in neuropeptide-Y- induced food intake. *Nature* **382**: 168-171.
- GERALD, C., WALKER, M.W., VAYSSE, P.J.J., HE, C., BRANCHEK, T.A. et WEINSHANK, R.L. (1995). Expression cloning and Pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/ peptide YY Y2 receptor subtype. *J. Biol. Chem.* **10**: 26758-26761.
- GIULIANI, S., TRAMONTANA, M., LECCI, A. et MAGGI, C.A. (1997). Effect of nociceptin on heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. *Eur. J. Pharmacol.* **333** : 177-179.
- GIULIANI, S., MAGGI, C.A. et MELI, A. (1989). Prejunctional modulatory action of neuropeptide Y on peripheral terminal of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Br. J. Pharmacol.* **98**: 407-412.
- GLOVER, I.D., BARLOW, D.J., PITTS, J.E., WOOD, S.P. et TICKLE, I.J. (1985). Conformational studies of the pancreatic polypeptide hormone family. *Eur. J. Biochem.* **142**: 379-385.
- GRANDT, D., SCHIMICZEK, M., RASCHER, W., FETH, F., SHIVELY, J., LEE, T.D., DAVIS, M.T., REEVE, J.R.Jr et MICHEL, M.C. (1996). Neuropeptide Y 3-36 is an endogenous ligand selective for Y2 receptors. *Regul. Pept.* **67**: 33-37.

- GRANDT, D., FETH, F., RASCHER, W., REEVE, J.R. JR, SCHLICKER, E., SCHIMICZEK, M., LAYER, P., GOEBELL, H., EYSSELEIN, V.E. et MICHEL, M.C. (1994). [Pro34]peptide YY is a Y1-selective agonist at peptide YY/neuropeptide Y receptors. *Eur J Pharmacol.* **269**:127-32.
- GRANDT, D., TEYSSEN, S., SCHIMICZEK, M., REEVE, J.R. Jr, FETH, F., RASCHER, W., HIRCHE, H., SINGER, M.V., LAYER, P., GOEBELL, H., HO, F.J. et EYSSELEIN, V.E. (1992). Novel generation of hormone receptor specificity by amino terminal processing of peptide YY. *Biochem Biophys Res Commun.* **186**:1299-306.
- GREGOR, P., FENG, Y., DECARR, L.B., CORNFIELD, L.J. et McCALEB, M.L. (1996). Molecular characterization of second mouse pancreatic polypeptide receptor and its inactivated human homologue. *J. Biol. Chem.* **271**: 27776-27781.
- GRUNDEMAR, L., SHEIKH, S.P. et WAHLESTEDT, C. (1993). Characterization of receptor types for neuropeptide Y and related peptides. In: Colmers W.F. & Wahlested, C. (Eds), *The biology of neuropeptide y and related peptides*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 197-240.
- GRUNDEMAR, L., KRSTENANSKY, J.L. et HÅKANSON, R. (1992). Neuropeptide Y and truncated neuropeptide Y analogs evoke histamine release from rat peritoneal mast cells. A direct effect on G proteins?. *Eur. J. Pharmacol.* **232**: 271-278.

- GRUNDEMAR, L., WAHLESTEDT, C. et REIS, D.J. (1991). Neuropeptide Y acts at an atypical receptor to evoke cardiovascular depression and to inhibit glutamate responsiveness in the brainstem. *J. Pharmacolo. Exp. Ther.* **258**: 633-638.
- GUERRINI, R., CALO, G., RIZZI, A., BIGONI, R., BIANCHI, C., SALVADORI, S. et REGOLI, D. (1998). A new selective antagonist of the nociceptin receptor. *Br. J. Pharmacol.* **123**: 163-165.
- GUERRINI, R., CALO, G., RIZZI, A., BIANCHI, C., LAZARUS, L.H., SALVADORI, S., TEMUSSI, P.A. et REGOLI, D. (1997). Address and message sequences for the nociceptin receptor: a structure- activity study of nociceptin-(1-13)-peptide amide. *J. Med. Chem.* **40**: 1789-1793.
- GUMUSEL, B., HAO, Q., HYMAN, A., CHANG, J-K, KAPUSTA, D.R. et LIPPTON H. (1997). Nociceptin: An endogenous agonist for central opioid-like1 (ORL1) receptors possesses systemic vasorelaxant properties. *Life Sci* **60**:PL141–5.
- HAIR, W.M., HUGHES, A., SCHACHTER, M. et SEVER, P. (1988). Neuropeptide Y-induced contraction in human saphenous vein: Effect of calcium antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **93**: 275 P.
- HAAS, H.L., HERMANN, A., GREEN, R.W. et CHAN-PALAY, V. (1987). Action and location of neuropeptide tyrosine (Y) on hippocampal neurons of the rat in slice preparations. *J. Comp. Neurol.* **257**: 208-215.
- HAAS, M., CHENG, B., RICHARDT, G., LANG, R.E. et SCHOMIG, A. (1989). Characterization and presynaptic modulation of stimulation-evoked exocytotic co-

release of noradrenaline and neuropeptide Y in guinea pig heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **340**: 509-515.

HAO, J.X., XU, I.S., WIESENFELD-HALLIN, Z. et XU, X.J. (1998). Anti-hyperalgesic and anti-allodynic effects of intrathecal nociceptin/orphanin FQ in rats after spinal cord injury, peripheral nerve injury and inflammation. *Pain* **76**:385-393.

HARFSTRAND, A. (1986). Intraventricular administration of neuropeptide Y (NPY) induces hypotension, bradycardia and bradypnoea in the awake unrestrained male rat. Counteraction by NPY-induced feeding behaviour. *Acta. Physiol. Scand.* **128**: 121-123.

HARFSTRAND, A., FUXE, K., AGNATI, L.F. ENEROTH, P., ZINI, I., ZOLI, M., ANDERSSON, K. von EULE, G. TERENIUS, L., MUTT, V. et GOLDSTEIN, M. (1986). Studies on neuropeptide Y-catecholamine interactions in the hypothalamus and in the forebrain of the male rat: relationship to neuroendocrine function. *Neurochem. Int.* **8**: 355-376.

HARRISON, L. et GRANDY, D.K. (2000). Opiate modulating properties of nociceptin/orphanin FQ. *Peptides* **21**: 151-172.

HASHIMOTO, Y., CALO, G., GUERRINI, R., SMITH, G. et LAMBERT, D.G. (2000) Antagonistic effects of [Nphe1]nociceptin(1-13)NH₂ on nociceptin receptor mediated inhibition of cAMP formation in Chinese ovary cells stably expressing the recombinant human nociceptin receptor. *Neurosci. Lett.*, **278**: 109-112.

- HAZELWOOD, R.L. (1993). The pancreatic polypeptide (PP-fold) family: Gastrointestinal, vascular, and feeding behavioral implication. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **202**:44-63.
- HEILIG, M. et WIDERLOV, E. (1995). Neurobiology and clinical aspects of neuropeptide Y. *Crit. Rev. Neurobiol.* **9**: 115-136.
- HEILIG, M., McLEOD, S., BROT, M., HEINRICHS, S.C., MENZAGHI, F., KOOB, G.F. et BRITTON, K.T. (1993). Anxiolytic-like action of neuropeptide Y: mediation by Y1 receptors in amygdala, and dissociation from food intake effects. *Neuropsychopharmacology.* **8**: 357-363.
- HEILIG, M. et MURISON, R. (1987). Intracerebroventricular neuropeptide Y suppresses open field and home cage activity in the rat. *Regul. Pept.* **19**: 221-231.
- HENDERSON, G. et McKNIGHT, A.T. (1997). The orphan opioid receptor and its endogenous ligand nociceptin/orphanin FQ. *Trends Pharmacol. Sci.* **18** : 293-300.
- HERZOG, H., HORT, Y.J., BALL, H.J., HAYES, G., SHINE, J. et SELBIE, L.A. (1992). Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **89**: 5794-5798.
- HEXUM, T.D., ZHENG, J. et ZHU, J. (1994). Neuropeptide Y inhibition of nicotinic receptor-mediated chromaffin cell secretion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**: 61-66.
- HIRABAYASHI, A., NISHIWAKI, K., SHIMADA, Y. et ISHIKAWA, N. (1996). Rôle of neuropeptide Y and its receptor subtypes in neurogenic pulmonary edema. *Eur. J. Pharmacol.* **296** : 297-305.

- HOLLOPETER, G., ERICKSON, J.C., SEELEY, R.J., MARSH, D.J. et PALMITER, R.D. (1998). Response of neuropeptide Y-deficient mice to feeding effectors. *Regul Pept.* **75-76**:383-9.
- HU, Y., BLOOMQUIST, B.T., CORNFIELD, L.J., DECARR, L.B., FLORESRIVEROS, J.R., FRIEDMAN, L., JIANG, P.L., LEWISHIGGINS, L., SADLOWSKI, Y., SCHAEFER, J., VELAZQUEZ, N. et MCCALEB, M.L. (1996). Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior. *J. Biol. Chem.* **271**: 26315-26319.
- HUNTER, L.W., TYCE, G.M. et RORIE, D.K. (1996). Neuropeptide Y release and contractile properties : differences between canine veins and arteries. *Eur. J. Pharmacol.* **313** : 79-87.
- IKEDA, K., WATANABE, M., ICHIKAWA, T., KOBAYASHI, T., YANO, R. et KUMANISHI, T. (1998). Distribution of prepro-nociceptin/orphanin FQ mRNA and its receptor mRNA in developing and adult mouse central nervous systems. *J Comp Neurol* **399**:139 –51.
- JACQUES, D., CADIEUX, A., DUMONT, Y. et QUIRION, R. (1995). Apparent affinity and potency of BIBP3226, a non-peptide neuropeptide Y receptor antagonist, on purported neuropeptide Y Y1, Y2 and Y3 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **278**: R3-5.
- JENCK, F., MOREAU, J.L., MARTIN, J.R., KILPATRICK, G.J., REINSCHIED, R.K., MONSMA, F.J., JR., NOTHACKER, H.P. et CIVELLI, O. (1997). Orphanin FQ

acts as an anxiolytic to attenuate behavioral responses to stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 14854-14858.

JOLICOEUR, F.B., MICHAUD, J.N. RIVEST, R., MENARD, D., GAUDIN, D., FOURNIER, A. et ST-PIERRE, S. (1991). Neurobehavioral profile of neuropeptide Y. *Brain Res. Bull.* **26**: 265-268.

KALRA, S.P. et CROWLEY, W.R. (1992). Neuropeptide Y: a novel neuroendocrine peptide in the control of pituitary hormone secretion, and its relation to luteinizing hormone. *Front Neuroendocrinol.* **13**: 1-46.

KALRA, S.P. et CROWLEY, W.R. (1984). Norepinephrine-like effects of neuropeptide Y on LH release in the rat. *Life Sci.* **35**: 1173-1176.

KAMEI, J., OHSAWA, M., KASHIWAZAKI, T. et NAGASE, H. (1999). Antinociceptive effects of the ORL1 receptor agonist nociceptin/orphanin FQ in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* **370** : 109-116.

KAPUSTA, D.R., SEZEN, S.F., CHANG, J.K., LIPPTON, H. et KENIGS, V.A. (1997). Diuretic and antinatriuretic responses produced by the endogenous opioid-like peptide, nociceptin (orphanin FQ). *Life Sci.* **60**: PL15-PL21.

KENAKIN T. (1996). The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems. *Pharmacol. Rev.* **48**: 413-463

KIEFFER, B.L., BEFORT, K., GAVERIAUX-RUFF, C. et HIRTH, C.G. (1992). The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 12048-12052.

- KIMMEL, J.R., HAYDEN, J. et POLLOCK, H.G. (1975). Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone. *J. Biol. Chem.* **250**: 9369-9376.
- KING, M.A., ROSSI, G.C., CHANG, A.H., WILLIAMS, L. et PASTER-NAK, G.W. (1997). Spinal analgesic activity of orphanin FQ/nociceptin and its fragments. *Neurosci. Lett.* **223** : 113-116.
- KUBO, T. et KIHARA, M. (1990). Modulation of the aortic baroreceptor reflex by neuropeptide Y, neurotensin and vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitari of the rat. *Naunyn-Schmiedlerberg's Arch. Pharmacol.* **342**: 182-188.
- KUENZEL, W.J. et McMURTY, J. (1988). Neuropeptide Y : brain localization and central effects on plasma insulin levels in chicks. *Physiol. Behav.* **44**: 669-678.
- LABURTHER, M. (1991). Peptide YY and neuropeptide Y in the intestine: availability, biologic effects and epithelial receptors. *Arch Int Physiol. Biochim. Biophys.* **99**:A177.
- LACHOWICZ, J.E., SHEN, Y., MONSMA, F.J. et SIBLEY, D.R. (1995). Molecular cloning of a novel G protein coupled receptor related to the opiate receptor family. *J. Neurochem.* **64**: 34-40.
- LARHAMMAR, D. (1996). Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul. Pept.* **62**:1-11.
- LARHAMMAR, D., BLOMQVIST, A.G. et SÖDERBERG, C. (1993). Evolution of neuropeptide Y and its related peptides, *Comp. Biochem. Physiol.* **106C**: 743-752.

- LARHAMMAR, D., BLOMQVIST, A.G., YEE, F., JAZIN, E., YOO, H. et WAHLESTEDT, C. (1992). Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY of the Y1-type. *J. Biol.Chem.* **267**: 10935-10938.
- LARSEN, P.J., SHEIKH, S.P., JAKOBSEN, C.R., SCHWARTZ, T.W. et MIKKELSEN, J.D. (1993). Regional distribution of putative NPY Y1 receptors and neurons expressing Y1 mRNA in forebrain areas of the rat central nervous system. *Eur. Neurosci.* **5**: 1622-1637.
- LEMOS, V.S. et TAKEDA, K. (1995). Neuropeptide Y2-type receptor-mediated activation of large conductance Ca^{2+} - sensitive K^{+} channels in human neuroblastoma cell line. *Pfuegers Arch. Eur. J. Physiol.* **430**: 534-540.
- LOUIE, D.S., WILLIAMS, J.A. et OWYANG, C. (1985). Action of pancreatic polypeptide on rat pancreatic secretion: in vivo and in vitro. *Am J Physiol.* **249**: G489-G495.
- LOU, L-G, MA, L. et PEI, G. (1997). Nociceptin/orphanin FQ activates protein kinase C, and this effect is mediated through phospholipase C/Ca 21 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **240**:304 –308.
- LUNDBERG, J.M., PERNOW, J., TATEMOTO, K. et DAHLOF, C. (1985). Pre- and postjunctional effects of NPY on sympathetic control of rat femoral artery. *Acta Physiol. Scand.* **123**: 511-513.

- LUNDBERG, J.M. et TATEMOTO, K. (1982). Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to alpha-adrenoceptor blockade. *Acta Physiol Scand.* **116**:393-402.
- LUNDELL, I., STATNICK, M.A., JOHNSON, D., SCHOBBER, D.A., STARBACK, P., GEHLERT, D.R. et LARHAMMAR, D. (1996). The cloned rat pancreatic polypeptide receptor exhibits profound differences to the orthologous human receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 5111-5115.
- LUNDELL, I., BLOMQVIST, A.G., BERGLUND, M.M., SCHOBBER, D.A., JOHNSON, D., STATNICK, M.A., GADSKI, R.A., GEHLERT, D.R. et LARHAMMAR, D. (1995). Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY. *J. Biol. Chem.* **270**: 29123-29128.
- MacKERELL, A.D., HEMSEN, A., LACROIX, J.S. et LUNDBERG, J.M. (1989). Analysis of structure-function relationships of neuropeptide Y using molecular dynamics simulations and pharmacological activity and binding measurements. *Regul. Pept.* **25**: 295-313.
- MacKERELL, A.D. (1988). Molecular modeling and dynamics of neuropeptide Y. *J. Comput. Aided Molec. Design.* **2**: 55-63.
- MAMIYA, T., NODA, Y., NISHI, M., TAKESHIMA, H. et NABESHIMA, T. (1998). Enhancement of spatial attention in nociceptin/orphanin FQ receptor-knockout mice. *Brain Res.* **783**:236-40.

- MANABE, T., NODA, Y., MAMIYA, T., KATAGIRI, H., HOUTANI, T., NISHI, M.,
NODA, T., TAKAHASHI, T., SUGIMOTO, T., NABE-SHIMA, T. et
TAKESHIMA, H. (1998). Facilitation of long-term potentiation and memory in
mice lacking nociceptin receptors. *Nature* **394**: 577-581.
- MARTIN, S.E. et PATTERSON, R.E. (1989). Coronary constriction due to neuropeptide
Y: alleviation with cyclooxygenase blockers. *Am J Physiol.* ;**257**:H927-H934.
- MATRAN, R., MARTLING, C.L. et LUNDBERG, J.M. (1989). Inhibition of
cholinergic and non-cholinergic bronchoconstriction in the guinea pig mediated
by neuropeptide Y and α 2-adrenoceptors and opiate receptors. *Eur. J. Pharmacol.*
163 : 15-23.
- MATSUMOTO, M., NOMURA, T., MOMOSE, K., IKEDA, Y., KONDOU, Y., AKIHO,
H., TOGAMI, J., KIMURA, Y., OKADA, M. et YAMAGUCHI, T. (1996).
Inactivation of a novel neuropeptide Y/peptide YY receptor gene in primate
species. *J. Biol. Chem.* **271**: 27217-27220.
- McDERMOTT, B.J., MILLAR, B.C. et PIPER, H.M. (1993). Cardiovascular effects of
neuropeptide Y: receptor interactions and cellular mechanisms. *Cardiovasc Res.*
1993; **27**: 893-905.
- MENTLEIN, R., DAHMS, P., GRANDT, D. et KRÜGER, R. (1993). Proteolytic
processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. *Regul.*
Pept. **49**: 133-144.

- MEUNIER, J.C. (1997). Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **340**: 1-15.
- MEUNIER, J.C., MOLLEREAU, C., TOLL, L., SUAUDEAU, C., MOISAND, C., ALVINERIE, P., BUTOUR, J.L., GUILLEMOT, J.C., FERRARA, P., MONSERRAT, B., MAZARGUIL, H., VASSART, G., PARMENTIER, M. et COSTENTIN, J. (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* **377**: 532-535.
- MICHEL, M.C., BECK-SICKINGER, A., COX, H., DOODS, H.N., HERZOG, H., LARHAMMAR, D., QUIRION, R., SCHWART, T. et WESTFALL, T. (1998). XVI. International Union of Pharmacology Recommendations for the Nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol. Rev.* **50**: 143-150.
- MICHEL, M.C. et RASCHER, W. (1995). Neuropeptide Y – a possible role in hypertension ? *J. Hypertens.* **13** : 385-395.
- MILLAR, B.C, WEIS, T., PIPER, H.M., WEBER, M., BORCHARD, U., McDERMOTT, B.J. et BALASUBRAMANIAM, A. (1991). Positive and negative contractile effects of neuropeptide Y on ventricular cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* **261**: H1727-H1733.
- MINER, J.L., DELTA-FERA, M.A., PATERSON, J.A. et BAILE, C.A. (1989). Lateral cerebroventricular injection of neuropeptide Y stimulates feeding in sheep. *Am. J. Physiol.* **257**: R383-R387.

- MOGIL, J.S., GRISEL, J.E., REINSCHIED, R.K., CIVELLI, O., BEL-KNAP, J.K. et GRANDY, D.K. (1996). Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neuroscience* **75**: 333-337.
- MOGHE, P.V. et TRANQUILLO, R.T. (1995). Stochasticity in membrane-localised 'Ligand-receptor-G protein' binding consequences for leukocyte movement behavior. *Ann. Biomed. Eng.* **23** : 257-267.
- MOLLEREAU, C., SIMONS, M.J., SOULARUE, P., LINERS, F., VASSART, G., MEUNIER, J.C. et PARMENTIER, M. (1996). Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**: 8666 - 8670.
- MOLLEREAU, C., PARMENTIER, M., MAILLEUX, P., BUTOUR, J.L., MOISAND, C., CHALON, P., CAPUT, D., VASSART, G. et MEUNIER, J.C. (1994). ORL1, a novel member of the opioid receptor family - Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.* **341**: 33-38.
- MORRIS, J.C. (1991). Pertussis toxin attenuates postsynaptic actions of neuropeptide Y on the guinea-pig uterine artery. *Eur. J. Pharmacol.* **203** : 275-281.
- MUNGLANI, R., HUDSPITH, M.J. et HUNT, S.P. (1996). The therapeutic potential of neuropeptide Y. Analgesic, axiolytic and antihypertensive. *Drugs* **52**: 371-389.
- NAKAMURA, M., SAKANAKA, C., AOKI, Y., OGASAWARA, H., TSUJI, T., KODAMA, H., MATSUMOTO, T., SHIMIZU, T. et NOMA, M. (1995). Identification of two isoforms of mouse neuropeptide Y-Y1 receptor generated by

alternative splicing. Isolation, genomic structure, and function expression of the receptor. *J. Biol. Chem.* **270**: 30102-30110.

NEER, E. (1995). Heterotrimeric G-proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**: 249-257.

NICHOLSON, J.R., PATERSON, S.J., MENZIES, J.R., CORBETT, A.D. et McKNIGHT, A.T. (1998). Pharmacological studies on the "orphan" opioid receptor in central and peripheral sites. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **76**: 304-313.

NISHI, M., TAKESHIMA, H., MORI, M., NAKAGAWARA, K. et TAKEUCHI, T. (1994). Structure and chromosomal mapping of genes for the mouse κ -opioid receptor and an opioid receptor homologue (MORC). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205** : 1353-1357.

NOTHACKER, H.P., REINSCHIED, R.K., MANSOUR, A., HENNINGSEN, R.A., ARDATI, A., MONSMA, F.J., WATSON, S.J. et CIVELLI, O. (1996). Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 8677-8682.

O'HARE, M.M.T. et SCHWARTZ, T.W. (1990). in *Degradation of bioactive substance: Physiology and Pathology*. J.H. Hendriksen, Ed. CRC Press. Boca Raton, FL.

OKAWA, H., NICOL, B., BIGONI, R., HIRST, R.A., CALO, G., GUERRINI, R., ROWBOTHAM, D.J., SMART, D., MCKNIGHT, A.T. et LAMBERT, D.G. (1999). Comparison of the effects of [Phe¹psi(CH₂-NH)Gly²]nociceptin(1-

13)NH₂ in rat brain, rat vas deferens and CHO cells expressing recombinant human nociceptin receptors. *Br. J. Pharmacol.* **127**:123-130.

OSINSKI, M.A., PAMPUSCH, M.S., MURTAUGH, M.P. et BROWN, D.R. (1999a).

Cloning, expression and functional role of a nociceptin/orphanin FQ receptor in the porcine gastrointestinal tract. *Eur. J. Pharmacol.* **365** : 281-289.

OSINSKI, M.A., BASS, P. et GAUMNITZ, E.A. (1999b). Peripheral and central actions

of orphanin FQ (nociceptin) on murine colon. *Am. J. Physiol.* **276**: G125-G131.

PAN, Y.X., XU, J., WAN, B.L., ZUCKERMAN, A. et PASTERNAK, G.W. (1998).

Identification and differential regional expression of KOR-3/ORL-1 gene splice variants in mouse brain. *FEBS Lett.* **435**: 65-68.

PARROTT, R.F., HEAVENS, R.P. et BALDWIN, B.A. (1986). Stimulation of feeding in

the satiated pig by intracerebroventricular injection of neuropeptide Y. *Physiol. Behav.* **36**: 523-525.

PAU, M.Y., PAU, K.Y. et SPIES, H.G. (1988). Characterization of central actions of

neuropeptide Y on food and water intake in rabbits. *Physiol. Behav.* **44**: 797-802.

PELUSO, J., LAFORGE, K.S., MATTHES, H.W., KREEK, M.J., KIEFFER, B.L. et

GAVERIAUX-RUFF, C. (1998). Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells. *J. Neuroimmunol.* **81**: 184-192.

- PERNEY, T.M. et MILLER, R.J. (1989). Two different G-proteins mediate neuropeptide Y and bradykinin-stimulated phospholipid breakdown in cultured rat sensory neurons. *J. Biol. Chem.* **264**: 7317-7327.
- PERNOW, J. et LUNDBERG, J.M. (1988). Neuropeptide Y induces potent contraction of arterial vascular smooth muscle via an endothelium-independent mechanism. *Acta Physiol. Scand.* **134**: 157-158
- PHENG, L.H. et REGOLI, D. (2000). Receptors for NPY in peripheral tissues: Bioassays. *Life Sci.* **67 (8)** : 847-862.
- PHENG, L.H., CALO, G., GUERRINI, R. et REGOLI, D. (2000a). [Nphe1]nociceptin-(1-13)NH₂ selectively antagonizes nociceptin effects in the rabbit isolated ileum. *Eur. J. Pharmacol.* **397(2-3)**:383-388.
- PHENG, L.H., CALO, G., GUERRINI, R. et REGOLI, D. (2000b). Pharmacological characterization of the nociceptin OP₄ receptor in the rat isolated colon. *Eur. J. Pharmacol.* (en préparation).
- PHENG, L.H. et REGOLI, D. (1998). Bioassays for NPY receptors : old and new. *Regul. Pept.* **75-76** : 79-87.
- PHENG, L.H., PERRON, A., QUIRION, R., CADIEUX, A., FAUCHÈRE, J.L., DUMONT, Y. et REGOLI, D. (1999). Neuropeptide Y-induced contraction is mediated by neuropeptide YY₂ and Y₄ receptors in the rat colon. *Eur. J. Pharmacol.* **374** : 85-91.

PHENG, L.H. et REGOLI D. (1998) Bioassays for NPY receptors: old and new. *Regul Pept.* **75-76**:79-87.

PHENG, L.H., FOURNIER, A, DUMONT, Y., QUIRION, R. et REGOLI, D. (1997a).
The dog saphenous vein: a sensitive and selective preparation for Y-2 receptor of neuropeptide Y. *Eur. J. Pharmacol.* **327** : 163-167.

PHENG, L.H., QUIRION, R., IYENGAR, S., FOURNIER, A. et REGOLI, D. (1997b).
The rabbit ileum: a sensitive and selective preparation for the neuropeptide Y Y-5 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **333** : R3-R5.

PLAYFORD, R.J. et COX, H.M. (1996). Peptide YY and neuropeptide Y : Two peptides intimately involved in electrolyte homeostasis. *Trends Pharmacol. Sci.* **17** : 436-438.

POMONIS, J.D., BILLINGTON, C.J. et LEVINE, A.S. (1996). Orphanin FQ, agonist of orphan opioid receptor ORL1, stimulates feeding in rats. *Neuroreport* **8**: 369-371.

POTTER, E.K. (1987). Presynaptic inhibition of cardiac vagal postganglionic nerves by neuropeptide Y. *Neurosci.lett.* **83**: 101-106.

POTTER, E.K. (1985). Prolonged non-adrenergic inhibition of cardiac action following sympathetic stimulation: neuromodulation by neuropeptide Y? *Neurosci. Lett.* **54**: 117-121.

QUIRION, R., MARTEL, J.C., DUMONT, Y., CADIEUX, A., JOLICOEUR, F. et ST-PIERRE, A. (1990). Neuropeptide Y receptor : autoradiographic distribution in the brain and structure-activity relationships. *Ann. NY Acad. Sci.* **611**: 58-72.

- REINSCHIED, R.K., NOTHACKER, H.P., BOURSON, A., ARDATI, A., HENNINGSSEN, R.A., BUNZOW, J.R., GRANDY, D.K., LANGEN, H., MONSMA JR., F.J. et CIVELLI, O. (1995). Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid like G protein- coupled receptor. *Science* **270**: 792-794.
- RIEDL, M., SHUSTER, S., VULCHANOVA, L., WANG, J., LOH, H.H. et ELDE R. (1996). Orphanin FQ/nociceptin-immunoreactive fibers parallel those containing endogenous opioids in rat spinal cord. *Neuroreport* **7**:1369-72.
- RIZZI, A., BIGONI, R., CALO, G., GUERRINI, R., SALVADORI, S. et REGOLI, D. (1999a). [Nphe¹]nociceptin(1-13)NH₂ antagonizes nociceptin effects in the mouse colon. *Eur. J. Pharmacol.* **385**: R3-R5.
- RIZZI, A., CALO, G., TREVISANI, M., TOGNETTO, M., FABBRI, L., MAPP, C., GUERRINI, R., SALVADORI, S., REGOLI, D. et GEPPETTI, P. (1999b). Nociceptin receptor activation inhibits tachykinergic non adrenergic non cholinergic contraction of guinea pig isolated bronchus. *Life Sci.* **64**: L157-163.
- ROSE, P.M., FERNANDES, P., LYNCH, J.S., FRAZIER, S.T., FISHER, S.M., KODUKULA, K., KIENZLE, B. et SEETHALA, R. (1995). Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. *J. Biol. Chem.* **270**: 22661-22664.
- RUDSKI, J.M., GRACE, M., KUSKOWSKI, M.A., BILLINGTON, C.J. et LEVINE, A.S. (1996). Behavioral effects of naloxone on neuropeptide Y-induced feeding. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **54**: 771-777.

- SANDIN, J.,GEORGIEVA,J., SCHOTT,P.A.,OGREN, S.O. et TERENCEUS, L. (1997). Nociceptin/orphanin FQ microinjected into hippocampus impairs spatial learning in rats. *Eur. J. Neurosci.* **9** : 194-197.
- SCHILD H.O. (1973). Receptor classification with special reference to beta adrenergic receptors. In *Drug receptors*. Edited by H.P. Rang, University Park press, Baltimore, Md.pp. 1129-1136.
- SCHWARTZ, T.W., SHEIKH, S.P. et O'HARE, M.M.I. (1989). Receptors on pheocromocytoma cells for two members of the PP-fold family-NPY and PP. *FEBS Lett.* **225**: 209-214.
- SHIBASAKI, T., ODA, T., IMAKI, T., LING, N. et DEMURA, H. (1993). Injection of anti-neuropeptide Y gamma-globulin into the hypothalamic paraventricular nucleus decreases food intake in rats. *Brain Res.* **601**: 313-316.
- SHEIKH, S.P. (1991). Neuropeptide Y and peptide YY: Major modulators of gastrointestinal blood flow and function. *Am. J. Physiol.* **261**: G701-G715.
- STANLEY, B.G. et LEIBOWITZ, S.F. (1984). Neuropeptide Y : stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci.* **35**: 2635-2642.
- STRATFORD, T.R., HOLAHAN, M.R. et KELLEY, A.E. (1997). Injections of nociceptin into nucleus accumbens shell or ventromedial hypothalamic nucleus increase food intake. *Neuroreport* **8**: 423-426.

- STRETTON, C.D., BELVISI, M.G. et BARNES PJ. (1990). Neuropeptide Y modulates non-adrenergic, non-cholinergic neural bronchoconstriction in vivo and in vitro. *Neuropeptides* **17**:163-70.
- SUNDLER, F., HAKANASON, R., EKBLAD, E., UDDMAN, R. et WAHLESTEDT, C. (1986). Neuropeptide Y in peripheral and enteric nervous systems. *Ann. Rev. Cytol.* **102**: 234-269.
- SUNDLER, F., MOGHIMAZADEH, E., HAKANSON, R., EKELUND, M. et EMSON, P. (1983). Nerves fibers in the gut and pancreas of the rat displaying neuropeptide Y immunoreactivity. Intrinsic and extrinsic origin. *Cell Tissue Res.* **230**: 487-493.
- TATEMOTO, K. (1982). Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 5485-5489.
- TATEMOTO, K., CARLQUIST, M. et MUTT, V. (1982). Neuropeptide Y: a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* **296**: 659-660.
- TATEMOTO, K. et MUTT, V. (1980). Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature.* **285**: 417-418.
- TAYLOR, F. et DICKENSON, A. (1998). Nociceptin/orphanin FQ. A new opioid, a new analgesic? *Neuroreport* **9**: R65-R70.
- TIAN, J.H., ZHANG, W., FANG, Y., XU, W., GRANDY, D.K. et HAN, J.S. (1998). Endogenous orphanin FQ: evidence for a role in the modulation of

electroacupuncture analgesia and the development of tolerance to analgesia produced by morphine and electroacupuncture. *Br. J. Pharmacol.* **124**: 21-26.

TIAN, J.H., XU, W., ZHANG, W., FANG, Y., GRISEL, J.E., MOGIL, J.S., GRANDY, D.K. et HAN, J.S. (1997). Involvement of endogenous orphanin FQ in electroacupuncture-induced analgesia. *Neuroreport*, **8**: 497-500.

TSAGARAKI, S., REES, L.H., BESSER, G.M. et GROSSMAN, A. (1989). Neuropeptide-Y stimulates CRF-41 release from rat hypothalami in vitro. *Brain Res.* **502**: 167-170.

TSENG, C-J., MOSQUEDA-GARCIA, R., APPALSAMY, M. et ROBERTSON, D. (1988). Cardiovascular effects of neuropeptide Y in rat brainstem nuclei. *Circ. Res.* **64**: 55-61.

UEDA, H., YAMAGUCHI, T., TOKUYAMA, S., INOUE, M., NISHI, M. et TAKESHIMA, H. (1997). Partial loss of tolerance liability to morphine analgesia in mice lacking the nociceptin receptor gene. *Neurosci. Lett.* **237**: 136-138.

VARANI, K., CALO, G., RIZZI, A., MERIGHI, S., TOTH, G., GUERRINI, R., SALVADORI, S., BOREA, P.A. et REGOLI, D. (1998). Nociceptin receptor binding in mouse forebrain membranes: thermodynamic characteristics and structure activity relationships. *Br. J. Pharmacol.* **125**: 1485-1490.

WAHLESTEDT, C. et REIS, D.J. (1993). Neuropeptide Y-related peptides and their receptors are the receptors potential therapeutic drug target ?. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**: 309-352.

- WAHLESTEDT, C., EKMAN, R. et WIDERLOV, E. (1989). Neuropeptide Y (NPY) and the central nervous system: distribution, effects and possible relationship to neurological and psychiatric disorder. *Proc. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **31**: 13-54.
- WAHLESTEDT, C., YANAIHARA, N. et HAKANSON, R. (1986). Evidence for different pre- and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptide. *Regul. Pept.* **13**: 307-318.
- WALTER, M.J., SCHERRER, J.M, FLOOD, J.F. et MORLEY, J.E. (1994). Effects of localized injections of neuropeptide Y antibody on motor activity and other behaviors. *Peptides* **15**: 607-613.
- WANG, Z-L., BENNET, W.M., WANG, R-M., GHATEI, M.A. et BLOOM, S.R. (1994a). Evidence of a paracrine rôle of neuropeptide-Y in the regulation of insulin release from pancreatic islets of normal and dexamethasone-treated rats. *Endocrinology* **135**: 200-206.
- WANG, J.B., JOHNSON, P.S., IMAI, Y., PERSICO, A.M., OZENBERGER, B.A., EPPLER, C.M. et UHL, G.R. (1994b). cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Lett.* **348**: 75-79.
- WEINBERG, G.H., SIRINATSINGHI, D.J.S., TAN, C.P.M., SHIAO, L.L., MORIN, N., RIGBY, M.R., HEAVENS, R.H., RAPOPORT, D.R., BAYNE, M.I., CASCIERI, M.A., STRADER, C.D., LINEMEYER, D.L. et MacNEIL, D.J. (1996). Cloning

and expression of a novel neuropeptide Y receptor. *J. Biol. Chem.* **271**: 16485-16488.

WHARTON, J., GORDON, L., BYRNE, J., HERZOG, H., SELBIE, L.A., MOORE, K., SULLIVAN, M.H.F., ELDER, M.G., MOSCOSO, G., TAYLOR, K.M., SHINE, J. et POLAK, J.M. (1993). Expression of the human neuropeptide tyrosine Y1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 687-691.

WHARTON J. et GULBENKIAN S. (1989). Peptides in the mammalian cardiovascular system. *Experientia - Supplementum.* **56**:292-316.

WIDDOWSON, P.S., ORDWAY, L.H., WAHLESTEDT, C. et EKMAN, R. (1992). Reduced neuropeptide Y concentrations in suicide brain. *J. Neurochem.* **59**: 73-80.

WIDERLOV, E., LINDSTROM, L.H., WAHLESTED, C. et EKMAN, R. (1988). Neuropeptide Y-possible involvement in depression and anxiety. In Nobel Conference on NPY, ed. V. Mutt, K. Fuxe, T. Hokfelt, 331-42. NY: Raven.

WICK, M.J., MINNERATH, S.R., ROY, S., RAMAKRISHNAN, S. et LOH, H.H. (1995). Expression of alternate forms of brain opioid 'orphan' receptor mRNA in activated human peripheral blood lymphocytes and lymphocytic cell lines. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **32**: 342-347.

WICK, M.J., MINNERATH, S.R., LIN, X., ELDE, R., LAW, P.Y. et LOH, H.H. (1994). Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **27**: 37-44.

- WIELAND, H.A., WILLIM, K. et DOODS, H.N. (1995). Receptor binding profiles of NPY analogues and fragments in different tissues and cell lines. *Peptides*. **16**: 1389-1394.
- WOOD, J.D. (1987). Physiology of the enteric nervous system. *Physiology of Gastrointestinal Tract*. 2nd Ed., Leonard R. Johnson, Raven Press. NY. pp. 67-109.
- XIE, G.X., MEUSER, T., PIETRUCK, C., SHARMA, M. et PALMER, P.P. (1999). Presence of opioid receptor-like (ORL1) receptor mRNA splice variants in peripheral sensory and sympathetic neural ganglia. *Life Sci*. **64**: 2029-2037.
- XU, I.S., WIESENFELD-HALLIN, Z. et XU, X.J. (1998). [Phe¹psi(CH₂-NH)Gly²]-nociceptin-(1-13)NH₂, a proposed antagonist of the nociceptin receptor, is a potent and stable agonist in the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.*, **249**: 127-130.
- YASUDA, K., RAYNOR, K., KONG, H., BREDER, C.D., TAKEDA, J., REISINE, T. et BELL, G.I. (1993). Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 6736-6740.
- YAZDANI, A., TAKAHASHI, T., BAGNOL, D., WATSON, S.J. et OWYANG, C. (1999). Functional significance of a newly discovered neuropeptide, orphanin FQ, in rat gastrointestinal motility. *Gastroenterology*, **116**: 108-117.
- ZHANG, G., MURRAY, T.F. et GRANDY, D.K. (1997). Orphanin FQ has an inhibitory effect on the guinea pig ileum and the mouse vas deferens. *Brain Res.*, **772**: 102-106.

LISTE DE PUBLICATIONS

PUBLICATIONS PREMIER AUTEUR

PHENG, L.H., CALO, G., GUERINI, R. et REGOLI, D. (2000). Pharmacological characterization of the nociceptin OP₄ receptor in the rat isolated colon. Eur. J. Pharmacol. (en préparation).

PHENG, L.H. et REGOLI, D. (2000). Receptors for NPY in peripheral tissues: Bioassays. Life Sci. **67 (8)** : 847-862.

PHENG, L.H. et REGOLI D. (1998) Bioassays for NPY receptors: old and new. Regul Pept. **75-76**:79-87.

PHENG, L.H., CALO, G., GUERRINI, R. et REGOLI, D. (2000). [Nphe¹]nociceptin-(1-13)NH₂ selectively antagonizes nociceptin effects in the rabbit isolated ileum. Eur. J. Pharmacol. **397(2-3)**:383-388.

PHENG, L.H., PERRON, A., QUIRION, R., CADIEUX, A., FAUCHÈRE, J.L., DUMONT, Y. et REGOLI, D. (1999). Neuropeptide Y-induced contraction is mediated by neuropeptide YY₂ and Y₄ receptors in the rat colon. Eur. J. Pharmacol. **374(1)** : 85-91.

PHENG, L.H., FOURNIER, A., DUMONT, Y., QUIRION, R. et REGOLI, D. (1997a). The dog saphenous vein: a sensitive and selective preparation for Y-2 receptor of neuropeptide Y. Eur. J. Pharmacol. **327 (2-3)**: 163-167.

PHENG, L.H., QUIRION, R., IYENAR, S., FOURNIER, A. et REGOLI, D. (1997b).

The rabbit ileum: a sensitive and selective preparation for the neuropeptide Y Y-5 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **333** (2-3) : R3-R5.

PHENG, L.H., NGUYEN-LE, X.K., NSA ALLOGHO, S., GOBEIL, F. et REGOLI, D.

(1997) Kinin receptors in the diabetic mouse. *Can J Physiol Pharmacol.* **75(6)**: 609-11.

PHENG, L.H., FRANCOEUR, C. et DENIS, M. (1995). The involvement of nitric oxide

in a mouse model of adult respiratory distress syndrome. *Inflammation.* **19(5)**:599-610.

PHENG, L.H. (1994). Caractérisation pharmacologique des récepteurs du NPY *in vitro*.

Mémoire de Maîtrise, Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

LISTE DE PUBLICATIONS

PUBLICATION CO-AUTEURS

- DUMONT, Y., CADIEUX, A., DOODS, H., **PHENG, L.H.**, ABOUNADER, R.,
HAMEL, E., JACQUES, D., REGOLI, D. et QUIRION R. (2000). BIIE0246, a
potent and highly selective non-peptide neuropeptide Y Y(2) receptor
antagonist. *Br J Pharmacol.* **129(6)**:1075-88.
- D'ORLEANS-JUSTE, P., SIROIS, M.G., EDELMAN, E.R., REGOLI, D., **PHENG,**
L.H., BKAILY, G. et LINDSEY, C.J.. (1997). DNA antisense strategies in the
study of receptors for vasoactive peptides, and of growth and wound-healing
factors. *Mol Cell Biochem.* **172(1-2)**:199-211.
- GOBEIL, F., NEUGEBAUER, W., NGUYEN-LE, X.K., NSA ALLOGHO, S., **PHENG,**
L.H., BLOUIN, D., WHALLEY, E.T. et REGOLI, D. (1997). Pharmacological
profiles of the human and rabbit B1 receptors. *Can J Physiol Pharmacol.*
75(6):591-5.
- NSA ALLOGHO, S., GOBEIL, F., **PHENG, L.H.**, NGUYEN-LE, X.K.,
NEUGEBAUER, W. et REGOLI, D. (1997). Antagonists for kinin B1 and B2
receptors in the mouse. *Can J Physiol Pharmacol.* **75(6)**:558-62.
- NSA ALLOGHO, S., NGUYEN-LE, X.K., GOBEIL, F., **PHENG, L.H.** et REGOLI, D.
(1997). Neurokinin receptors (NK1, NK2) in the mouse: a pharmacological
study. *Can J Physiol Pharmacol.* **75(6)**:552-557

- NGUYEN-LE, X.K., NEUGEBAUER, W., GOBEIL, F., **PHENG, L.H.**, NSA ALLOGHO, S. et REGOLI, D. (1997). Pharmacological heterogeneity of neurotensin receptors: an in vitro study. *Can J Physiol Pharmacol.* **75(6)**:547-51.
- GOBEIL, F., NEUGEBAUER, W., FILTEAU, C., JUKIC, D., ALLOGHO, S.N., **PHENG, L.H.**, NGUYEN-LE, X.K., BLOUIN, D. et REGOLI, D. (1996) Structure-activity studies of B1 receptor-related peptides. *Antagonists. Hypertension.* **28(5)**:833-9.
- GOBEIL, F., FILTEAU, C., **PHENG, L.H.**, NGUYEN-LE, X.K. et REGOLI, D. (1996). In vivo characterization of B2 receptors mediating hypotension in anesthetized rabbits and guinea pigs. *Immunopharmacology.* **33(1-3)**:284-6.
- REGOLI, D., **PHENG, L.H.**, ALLOGHO, S.N., NGUYEN-LE, X.K. et GOBEIL, F. (1996) Receptors for kinins: from classical pharmacology to molecular biology. *Immunopharmacology.* **33(1-3)**:116-22.
- REGOLI, D., **PHENG, L.H.**, ALLOGHO, S.N., NGUYEN-LE, X.K. et GOBEIL, F. (1996). Receptors for kinins: from classical pharmacology to molecular biology. *Immunopharmacology.* 1996 Jun;**33(1-3)**:24-31.
- NGUYEN-LE, X.K., NGUYEN, Q.T., GOBEIL, F., **PHENG, L.H.**, EMONDS-ALT, X., BRELIERE, J.C. et REGOLI, D. (1996). Pharmacological characterization of SR 142801: a new non-peptide antagonist of the neurokinin NK-3 receptor. *Pharmacology.* **52(5)**:283-91.

- GOBEIL, F., **PHENG, L.H.**, BADINI, I., NGUYEN-LE, X.K., PIZARD, A., RIZZI, A., BLOUIN, D. et REGOLI, D. (1996). Receptors for kinins in the human isolated umbilical vein. *Br J Pharmacol.* **118(2)**:289-94.
- GOBEIL, F., FILTEAU, C., **PHENG, L.H.**, JUKIC, D., NGUYEN-LE, X.K. et REGOLI D. (1996) In vitro and in vivo characterization of bradykinin B2 receptors in the rabbit and the guinea pig. *Can J Physiol Pharmacol.* **74(2)**:137-44.
- ALLOGHO, S.N., GOBEIL, F., **PHENG, L.H.**, NGUYEN-LE, X.K., NEUGEBAUER, W., REGOLI, D. (1995). Kinin B1 and B2 receptors in the mouse. *Can J Physiol Pharmacol.* **73(12)**:1759-64.
- DUMONT, Y., CADIEUX, A., **PHENG, L.H.**, FOURNIER, A., ST-PIERRE, S. et QUIRION, R. (1994). Peptide YY derivatives as selective neuropeptide Y/peptide YY Y1 and Y2 agonists devoided of activity for the Y3 receptor subtype. *Brain Res Mol Brain Res.* **26(1-2)**:320-4.
- FOURNIER, A., GAGNON, D., QUIRION, R., CADIEUX, A., DUMONT, Y., **PHENG, L.H.** et ST-PIERRE S. (1994). Conformational and biological studies of neuropeptide Y analogs containing structural alterations. *Mol Pharmacol.* **45(1)**:93-101.
- CADIEUX, A., **PHENG, L.H.**, ST-PIERRE, S., FOURNIER, A., T-BENCHEKROUN, M.T.. (1993). The rabbit saphenous vein: a tissue preparation specifically enriched in NPY-Y1 receptor subtype. *Regul Pept.* **46(3)**:557-64.

DUMONT, Y., SATOH, H., CADIEUX, A., TAOUDI-BENCHEKROUN, M., **PHENG, L.H.**, ST-PIERRE, S., FOURNIER, A. et QUIRION, R. (1993). Evaluation of truncated neuropeptide Y analogues with modifications of the tyrosine residue in position 1 on Y1, Y2 and Y3 receptor sub-types. *Eur J Pharmacol.* **238(1)**:37-45.